

認知症治療薬の適正使用に関する研究

～ドネペジルとメマンチンの

精神科薬物療法に対する有用性の検討～

2018

中村 友喜

**Investigation into proper use of anti-dementia drugs**

**~ Examinations of the usefulness of donepezil  
and memantine for psychiatric pharmacotherapy ~**

**2018**

**Tomohisa Nakamura**

# 目次

緒 言 .....	1
第 1 章 AD 患者における認知症治療薬と向精神薬の 適正使用に関する処方調査 .....	4
— 方 法 — .....	4
1. 対象 .....	4
2. 調査・評価項目 .....	4
3. 統計学的解析 .....	5
4. 倫理的配慮 .....	6
— 結 果 — .....	6
1. 対象患者 .....	6
2. 処方状況 .....	7
2-1. 認知症治療薬処方状況 .....	7
2-2. 認知症治療薬と抗精神病薬 .....	7
2-3. 認知症治療薬と睡眠薬 .....	7
2-4. 認知症治療薬とその他の併用薬 .....	8
3. 認知症治療薬と向精神薬の等価換算値 .....	8
— 考 察 — .....	9
— 第 1 章 図表 — .....	11
表 1-1 処方調査対象者の背景 .....	11
図 1-1 併用されていた睡眠薬と抗精神病薬の処方率 .....	12
図 1-2 併用されていた抗精神病薬の種類と処方率 .....	13
図 1-3 併用されていた睡眠薬の種類と処方率 .....	14
表 1-2 治療薬の処方患者数および処方率 .....	15
図 1-4 抗精神病薬と睡眠薬の処方量 .....	16
第 2 章 DNP および MEM のマウスの行動および睡眠への影響 .....	17
— 実験手順 — .....	17
1. 試薬および材料 .....	17
2. DNP および MEM による自発運動に対する影響 .....	18
3. DNP および MEM によるペントバルビタール誘発睡眠に対する影響 .....	18
4. 統計学的解析 .....	18
— 結 果 — .....	18
1. DNP および MEM による自発運動に対する影響 .....	18
2. DNP および MEM によるペントバルビタール誘発睡眠に対する影響 .....	19

— 考 察 — .....	19
— 第2章 図表 — .....	21
図 2-1 自発運動に対する DNP と MEM の影響 .....	21
図 2-2 ペントバルビタール誘発睡眠（睡眠潜時）に対する DNP と MEM の影響 .....	22
図 2-3 ペントバルビタール誘発睡眠（睡眠時間）に対する DNP と MEM の影響 .....	23
 第3章 ドネペジル・メマンチン同時 LC/MS/MS 分析法の開発 .....	24
— 実験手順 — .....	25
1. 試薬および材料 .....	25
2. 内部標準溶液および混合標準溶液の調製 .....	25
3. 液体クロマトグラフィー .....	25
4. MS/MS .....	25
5. LC/MS/MS を用いた DNP および MEM の マウス血清濃度の測定および回収率の検討 .....	26
— 結 果 — .....	26
1. LC/MS/MS 分析のための条件の最適化 .....	26
2. マウス血清中の濃度の測定 .....	27
— 考 察 — .....	27
— 第3章 図表 — .....	29
表 3-1 LC の流速およびグラジエント条件 .....	29
表 3-2 タンデム質量分析計の分析共通パラメータ .....	30
図 3-1 LC/MS/MS による検量線の作成とサンプル測定手順 .....	31
図 3-2 DNP、MEM および IS から生成される プロダクトイオンとプリカーサーイオンのマススペクトラム .....	32
図 3-3 DNP、MEM および IS の HPLC のクロマトグラム .....	33
表 3-3 LC/MS/MS によるマウス標準血清を用いた DNP および MEM の検量線 .....	34
図 3-4 DNP および MEM のマウス血清中濃度の推移 .....	35
表 3-4 DNP および MEM のマウス血清中濃度に関するパラメータ .....	36
 第4章 AD 患者における DNP・MEM の血清中濃度の測定 .....	37
— 実験手順 — .....	38
1. 倫理的配慮 .....	38
2. 試薬および材料 .....	38

3. 内部標準溶液および混合標準溶液の調製、 液体クロマトグラフィー、MS/MS .....	38
4. LC/MS/MS 分析における定量精度の評価 .....	38
5. LC/MS/MS を用いた MEM および DNP の血清濃度の測定 .....	39
— 結 果 — .....	39
1. LC/MS/MS 分析を用いたヒト血清中 DNP・MEM の定量精度の評価	39
2. ヒト血清中の濃度の測定 .....	40
— 考 察 — .....	40
— 第4章 図表 — .....	43
表 4-1 LC/MS/MS 分析を用いた ヒト血清中 DNP・MEM の定量精度の評価 .....	43
表 4-2 LC/MS/MS によるヒト標準血清を用いた DNP および MEM の検量線 .....	44
表 4-3 DNP、MEM 内服中の各 AD 患者における それぞれの薬剤の血清中濃度 .....	45
表 4-4 DNP、MEM 内服中の AD 患者群における それぞれの薬剤の血清中濃度 .....	46
図 4-1 DNP および MEM の投与量/体重と血清中濃度 .....	47
結 語 .....	48
利益相反 .....	49
引用文献 .....	50
謝辞 .....	54
Abstract .....	55

## 緒 言

2013年に米国精神医学会より発表された *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth edition (DSM-5)* では、認知症は、A.1 つ以上の認知領域（複雑性注意・実行機能・学習及び記憶・言語・知覚 - 運動・社会的認知）において、以前の行為水準から有意な 認知の低下があるという証拠が以下に基づいている (1)本人、本人をよく知る情報提供者、または臨床家による有意な 認知機能の低下があったという懸念 (2)標準化された神経心理学的検査によって、それがなければ他の定量化された臨床評価によって記録された実質的な認知行為の障害 B.毎日の活動において、認知欠損が自立を阻害する C.認知欠損はせん妄の状況でのみ起こるものではない D.認知欠損は他の精神疾患によってうまく説明されないと定義されている<sup>1)</sup>。

内閣府より発表された「平成 29 年度高齢社会白書」では、2012 年の日本の認知症患者は 462 万人とされており、2025 年には 700 万人に達すると見込まれている<sup>2)</sup>。また、2013 年の厚生労働省の調査によると、約 462 万人の日本人の認知症患者のうち、67.6 %が神経変性認知症の中のアルツハイマー型認知症 (Alzheimer typed dementia : AD) であったと報告されており、日本を含む世界の多くの国で最も頻度が高い認知症である。

AD の神経病理学的変化としては、老人斑や神経原繊維変化、神経細胞やシナプスの消失があげられ、これに伴って AD の諸症状が発現するとされている。AD の症状は記憶障害、実行機能障害、失認、失語、失効、見当識障害などの中核症状と妄想、幻覚、抑うつ、睡眠障害、暴力などの認知症に伴う行動・心理症状 (behavioral and psychological symptoms of dementia : BPSD) に分類される。AD の記憶障害については、神経化学的にはマイネルト基底核から投射されるアセチルコリン (acetylcholine : ACh) 作動系神経におけるコリンアセチルトランスフェラーゼの活性低下や神経細胞の早期脱落が原因と考えられており、コリンエステラーゼ阻害薬 (cholinesterase inhibitor : ChEI) であるドネペジル塩酸塩 (donepezil hydrochloride : DNP) ・ ガランタミン臭化水素酸塩 (galantamine hydrobromide : GAL) ・ リバスタグミン (rivastigmine : RIV) はシナプス間隙内のコリンエステラーゼを阻害することで神経伝達のために重要な Ach 量を増加させ、記憶障害の改善に直接的な効果を示すとされている。これらの薬剤のうち、DNP は最初に承認された ChEI である。また、GAL は、アセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase : AchE) に対する競合的阻害に加えて、ニコチン性 ACh 受容体に対するアロステリック増強作用により脳内 ACh 機能を増強させ、RIV は AchE 阻害作用に加えて、ブチリルコリンエステラ

ーゼ(butyrylcholinesterase : BuChE)阻害作用も有することなどがそれぞれの薬剤の薬理学的な特徴として挙げられる。

また、グルタミン酸受容体の一つである *N*-メチル-D-アスパラギン酸 (*N*-methyl-D-aspartate : NMDA) 受容体は脳皮質や海馬に高密度に存在し、カルシウムイオンの流入を調整することで、記憶に関する長期増強や発達可塑性に対する中心的な役割を担っている。AD 患者ではシナプス間隙のグルタミン酸濃度が病的に持続的に上昇しており、そのためシナプス間での情報伝達に障害が起きていると考えられている。NMDA 受容体拮抗薬であるメマンチン塩酸塩 (memantine hydrochloride : MEM) は、NMDA 受容体を部分的に遮断して、細胞内へのカルシウムイオンの過剰流入を抑制することで、シナプス間での情報伝達改善や神経細胞死を抑制する。

これらの 4 剤における AD の中核症状の進行抑制効果については基本的な差はないとされているが、臨床では AD の進行度や薬剤の剤形、併存する BPSD の種類など、いくつかの使い分けのポイントが存在する。AD の重症度に対して、すべての ChEI は軽度～中等度で治療に用いることができ、中等度以上では MEM も使用可能となる。さらに重度になった場合には DNP と MEM のみが適応となっている。また、その患者に好ましい剤型に対して、DNP、GAL、MEM はいずれも経口剤として様々な剤形が選択可能となっており、AD 患者のライフスタイルや介護必要度などによって剤形を使い分けることができるが、RIV については経皮吸収型製剤のみである。患者の肝機能や腎機能によっては、DNP と GAL は CYP3A4, 2D6 で主に代謝されるのに対して RIV は硫酸抱合を受けるという違いがある。また MEM ほとんどが未変化体のまま尿中排泄であることから、腎機能障害を有する患者では、AUC の増加および半減期の延長が認められており、高度の腎機能障害(クレアチニンクリアランス値 : 30 mL/min 未満)の患者では、維持量の上限が 1 日 1 回 10 mg となっている。かかりつけ医のための BPSD に対応する向精神薬使用ガイドライン(第 2 版)<sup>4)</sup>では、ChEI は抑うつ、意欲低下、不安、幻覚、妄想、興奮・攻撃性、易刺激性などに有効との報告があるが、薬剤・研究間でのばらつきがあり、実臨床では症例ごとに薬効評価の必要性を訴えており、活動性亢進に関連する BPSD (興奮、不眠、不穏、幻覚など) の出現に注意喚起がなされている。また MEM は妄想、興奮・攻撃性、易刺激性に効果があったとの報告と有意差を認めなかったとする報告があるとしており、けいれんの既往、腎機能障害、重症尿路感染などの尿 pH を上昇させる要因に注意喚起がなされている。特に AD 患者が精神症状の悪化により精神科病院に入院に至った場合、投与されている ChEI を中止することで精神症状が改善し、退院に至るケースをしばしば経験する。認知症治療薬は有効量を継続的に服薬することが AD の中核症状の進行抑制につながることは周知の事実であるが、

本来であれば有効に使用されるはずの薬剤が治療者側の要因により有害事象が発現し、患者や支援者に精神的・身体的・経済的負担を強いることは回避すべきことである。

また、AD 患者の BPSD に精神科薬物療法を実施する場合、注意すべき要素には、加齢に伴う生体機能の変化や身体合併症治療薬と向精神薬の相互作用、認知症の進行に伴う自己の状態表出の困難化などに注意が必要である。加齢に伴う生体機能の変化としては、相対的な脂肪量の増加や肝・腎機能の低下などがあげられる。精神科薬物療法に用いられる向精神薬の多くは脂溶性が高いことや、肝代謝酵素チトクローム P450 による薬物代謝能の低下、糸球体ろ過率や腎血流量の低下による尿中排泄速度の低下などによって、薬物の半減期が延長する可能性がある。また、身体合併症の増加は合併症による生体機能の低下による向精神薬の有害事象発現率を増加させるだけでなく、合併症治療薬と向精神薬の相互作用を引き起こす可能性がある。また認知症患者では、症状の重症化に伴い、自分自身の身体的症状や精神状態を的確に表出することは困難になってくる。これらの点には十分な注意を要するが、有害事象を回避することに注力過多となることで、消極的な薬物療法に傾き、精神症状が改善されないという事態は回避すべきである。

そこで本研究では薬剤師の視点から、精神症状が改善され、かつ、有害事象や日常生活動作 (activities of daily living : ADL) に対する悪影響は最小限となる薬物療法を組み立てるために、現在 AD 患者に起こっている臨床上的の問題点を整理し、これらに対する対応策を基礎的研究の結果から検討することを目的として、処方調査、マウスによる行動薬理学実験、LC/MS/MS を用いた認知症治療薬の血清中濃度測定の一連の研究結果から、DNP と MEM の臨床での問題点を整理し、AD 患者に対してより有効かつ安全な薬物療法を提供できる対策を検討した。

## 第 1 章 AD 患者における認知症治療薬と向精神薬の 適正使用に関する処方調査

精神科病院に入院する認知症患者は、BPSD が激しく、家族や施設での対応困難が入院の原因である事例が多い。一般に、BPSD に対しては、薬物療法以外の対応も重要であり、薬物療法に優先して非薬物療法を考慮すること、薬物療法に用いる向精神薬については常に減量・中止を検討し、長期の使用は避けることが推奨されている<sup>4),5)</sup>。抗精神病薬や睡眠薬などの向精神薬が鎮静効果を期待して処方される場合、抗精神病薬による過鎮静や低血圧、ベンゾジアゼピン系薬による嚥下障害や傾眠などの有害反応から、誤嚥性肺炎や転倒骨折等の患者の予後や ADL に関する重大なアクシデントに発展することもある。

認知症治療薬のうち、DNP、GAL、RIV の ChEI が抑うつ、アパシー・意欲低下および不安に有効であったとの報告はあるが<sup>6)</sup>、臨床では、これらの薬剤が BPSD の悪化に起因していると考えられる事例を経験することがある。また、NMDA 受容体拮抗薬であるメマンチン MEM は、BPSD のうち、興奮や攻撃性に有効との報告がある<sup>7)</sup>。さらに、DNP と MEM の併用療法については、認知、ADL および行動に対する改善効果が示されており<sup>8)</sup>、臨床でも中等度以上の AD 患者に対してこれらの 2 剤の併用療法が行われている。

第 1 章では、AD 患者における認知症治療薬と向精神薬の適正使用を提案するために、ChEI と MEM の内服状況と抗精神病薬と睡眠薬の併用および投与量について処方調査を行った。

### － 方 法 －

#### 1. 対象

平成 26 年 4 月 1 日から平成 29 年 3 月末日の間に、三重県立こころの医療センター（当センター）に入院かつ退院となった患者のうち、主病名が AD であった患者を対象とした。

#### 2. 調査・評価項目

対象患者について、1)年齢、2)性別、3)在院日数、4)入院中に最後に測定した体重、5)退院前 1 週間における平均脈拍数、6)退院前 1 週間における平均血圧(収縮期および拡張期)、7)入院時に実施した血液検査および入院中の最終の血液検査結果のうち、肝機能に関する指

標として、DNP の添付文書の副作用項目に挙げられているアラニントランスアミナーゼ (alanine transaminase : ALT)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (aspartate transaminase : AST)、アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase : ALP) および  $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (gamma-glutamyl transpeptidase :  $\gamma$ -GTP)、栄養状態の指標として血清アルブミン値 (serum albumin : ALB)、腎機能の指標として、血清尿素窒素値 (blood urea nitrogen : BUN)、血清カリウム値 (カリウム)、推算糸球体濾過量 (estimated glomerular filtration rate : eGFR)、血清クレアチニン値 (serum creatinine : CRE)、Cockcroft-Gault の式によるクレアチニクリアランス推定値 (creatinine clearance : CCr)、8) 退院時の処方内容について定期的(頓用使用は除外)に使用している薬剤について、患者カルテから後方視的に情報を収集し、データベースを構築した。各対象患者の処方内容に関しては、投与されている処方薬の種類と投与量を記録した上で、抗精神病薬はクロルプロマジン(CP)、睡眠薬と抗不安薬はジアゼパム(DAP)に換算した投与量を算出した。これらのデータベースから認知症治療薬の使用状況に関する解析を行った。各カテゴリーの投与量の算出にあたっては、稲垣・稲田の等価換算<sup>9)10)</sup>を用いた。ただし、睡眠薬については、ラメルテオンとスボレキサントは等価換算ができないことから、非ベンゾジアゼピン (非 BZD) 系薬は、ゾピクロン、エスゾピクロン、ゾルピデムとし、前述の 2 剤についてはそれぞれ別に検討した。

また、急性腎障害のリスク所見として、BUN、CRE、カリウムの全てが当センター検査基準値を上回っていることとした。新たな慢性腎障害のリスク所見として、CKD 診療ガイド 2012<sup>11)</sup>を参考に、泌尿器感染症の合併や器質的疾患がなく、入院時の血液検査結果と入院時の最終血液検査結果を比較し、eGFR が新たに 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> 未満となっていることとした。高血圧の基準値は、高血圧治療ガイドライン 2014<sup>12)</sup>に沿って、65 歳から 74 歳以下で 140/90 mmHg 以上、75 歳以上で 150/90 mmHg 以上とした。脈拍に関しては、50 回/分以下を徐脈、100 回/分以上を頻脈とした。

### 3. 統計学的解析

抗精神病薬および睡眠薬の処方率については、4×2 のクロス集計を用いカイ二乗検定にて有意差があった項目について、残差を検証した。抗精神病薬および睡眠薬の等価換算値の有意検定にはクラスカル・ウォリス検定を用いて有意差があった項目について、各群間の比較をスティール・ドゥワス検定を用いて行った。また、各群間における対象者の背景項目の有意検定には、分散分析を用いて有意差があった項目についてテューキー・クレーマー法を用いて検定を行った。

2 群間の比較にはデータの分布に応じて、マン・ホイットニーの U 検定またはスチューデントの t 検定を用いた。いずれの検定においても統計ソフトは SPSS version 20 (IBM 社製) を用い、危険率 5 %未満( $p < 0.05$ )の場合を有意差ありと判定した。

#### 4. 倫理的配慮

本調査や解析では、特定の個人を識別することができないように匿名化した上でデータベースを構築し、個人情報情報を慎重に取り扱い、十分に倫理的に配慮しながら実施した。本研究については三重県立こころの医療センター研究倫理委員会の承認（承認番号：第 201601 号）を受け実施している。

## － 結 果 －

### 1. 対象患者

調査対象者の背景要因および当センターの血液検査項目の基準値を表 1-1 に示す。平成 26 年 4 月 1 日から平成 29 年 3 月末日の間に、三重県立こころの医療センターに入院かつ退院となった患者のうち、主病名がアルツハイマー型認知症であった患者は 84 例（男性 45 例、女性 39 例）で、対象の年齢は  $80.7 \pm 5.9$ （平均値  $\pm$  標準偏差）歳、在院日数は  $97.7 \pm 44.0$  日であった。

血液検査の結果について入院時と退院前に実施した血液検査の結果を比較したところ、腎機能については、急性腎障害のリスクがあると考えられる患者はみられなかった。また、慢性腎障害のリスクが認められたのは 7 例（処方なし群 4 例、ChEI 単剤群 1 例、MEM 単剤群 1 例、ChEI・MEM 併用群 1 例）であったが、入院時の検査結果の中央値が  $63.7 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ （最小値：60.2—最大値：70.5）であったのに対して入院時の最終検査結果では  $57.3 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ （52.2—59.7）であった。また、肝機能については、AST 値および ALT 値が当センター検査基準値を上回っていた患者は、処方なし群で 1 例みられた。平均 ALB 値は  $3.6 \pm 0.4 \text{ g/dL}$  であり、68 例で当院の検査基準値（4.1 - 5.3 g/dL）よりも低い値を示していた。また、19 例で新たに ALB 値の低下が認められた（処方なし群 9 例、ChEI 単剤群 1 例、MEM 単剤群 7 例、ChEI・MEM 併用群 2 例）。

血圧については、高血圧の基準を超える患者はみられなかった。脈拍については、頻脈または徐脈の患者はみられなかった。

## 2. 処方状況

### 2-1. 認知症治療薬処方状況

認知症治療薬が処方されていたのは 42 例で、そのうち ChEI のみが処方されていた患者 (ChEI 単剤群) は 12 例 (DNP: 11 例、GAL 1 例)、MEM のみが処方されていた患者 (MEM 単剤群) 24 例、ChEI と MEM が併用されていた患者 (ChEI・MEM 併用群) は 6 例 (DNP と MEM の併用: 5 例、GAL と MEM の併用 1 例)、認知症治療薬が処方されていない患者 (処方なし群) は 42 例であった。また、今回の調査では RIV が処方されている患者はみられなかった。

DNP の 1 日平均処方量は DNP 単剤群では  $5.1 \pm 1.8$  mg、ChEI・MEM 併用群では  $7.0 \pm 2.4$  mg であり、MEM の 1 日平均処方量は MEM 単剤群では  $17.3 \pm 4.3$  mg、ChEI・MEM 併用群では  $19.0 \pm 2.0$  mg であった。DNP と MEM について、単剤群と併用群の投与量にはマン・ホイットニー検定において有意差はみられなかった。また、GAL の投与量は ChEI 単剤投与群では 8 mg、ChEI・MEM 併用群では 16 mg であった。また、患者背景に関する調査項目について、それぞれの項目について各群間で有意差はみとめられなかった。

### 2-2. 認知症治療薬と抗精神病薬

対象者のうち、抗精神病薬が処方されていたのは 83.3% であり、処方なし群で処方率が最も高く (92.2%)、次いで ChEI 単剤群 (83.3%)、MEM 単剤群 (70.8%)、ChEI・MEM 併用群 (66.7%) の順となっていた (図 1-1)。全体において最も処方されていたのは、リスペリドン (中央値 1 mg 最小値 0.5 mg - 最大値 2.5 mg)、次いでクエチアピン (31 mg 12.5 mg - 250 mg)、オランザピン (4 mg 2.5 mg - 10 mg)、チアプリド (50 mg 15 mg - 50 mg)、アリピプラゾール (9 mg 6 mg - 9 mg) の順であった。その他に、ブロナンセリン 1 例、ハロペリドール 1 例、レボメプロマジン 1 例がみられた。アリピプラゾールは 5 例中 4 例がクエチアピンとの併用であった。またカイ二乗検定を用いた解析において、リスペリドンの処方率は処方なし群で有意に高く、ChEI 単剤群及び MEM 単剤群で有意に低くなっていた。同様にチアプリドの処方率においても、ChEI・MEM 併用群で有意に高く、処方なし群で有意に低い値を示していた。(図 1-2)。

### 2-3. 認知症治療薬と睡眠薬

対象者のうち、睡眠薬が処方されていたのは 54.8% であり、カイ二乗検定を用いた解析により、ChEI 単剤群は他群よりも有意に高い処方率を示していた (図 1-3)。全体において最も処方されていたのは、ベンゾジアゼピン (BZD) 系薬であるプロチゾラム 17 例 (中央値 0.25 mg 最小値 0.25 mg - 最大値 0.5 mg)、次いでフルニトラゼパム 8 例 (2 mg

1 mg – 4 mg)、非 BZD 系薬のエスゾピクロン 6 例 (2 mg – 1 mg – 3 mg) の順であった。その他に、ゾピクロン (7.5 mg)、ゾルピデム (5 mg)、スボレキサント (15 mg)、ラメルテオン (8 mg) がそれぞれ 5 例ずつみられた。また、カイ二乗検定を用いた解析において、ベンゾジアゼピン系睡眠薬の処方率では、ChEI 単剤群が有意に高く、MEM 単剤群は有意に低い値を示していた。また、スボレキサントとラメルテオンの処方率は、MEM 単剤群で有意に高く、処方なし群で有意に低い値を示していた。

#### 2-4. 認知症治療薬とその他の併用薬

治療薬の処方率を表 1-2 に示す。

抗うつ薬の処方率は 15.5 % (13 例) であり、そのうちの 5 例にトラゾドン (中央値 25 mg 最小値 25 mg – 最大値 50 mg) が、4 例にミルタザピン (15 mg – 15 mg – 45 mg) が処方されていた。また、セルトラリンが 3 例、パロキセチンが 1 例処方されていた。

気分安定薬の処方率は 13.1 % (11 例) であり、11 例中 10 例にバルプロ酸ナトリウム (中央値 400 mg 最小値 200 mg – 最大値 1200 mg) が、1 例にカルバマゼピンが処方されていた。炭酸リチウムとラモトリギンについては、処方されていなかった。

抗不安薬については処方率が 3.6 % (3 例) で向精神薬の中でも処方率は最も低く、ロラゼパム 2 例、エチゾラムおよびロフラゼブ酸エチルがそれぞれ 1 例ずつであった。

抗パーキンソン薬については、ピペリデン処方例が 3 例、アマンタジン処方例が 1 例、レボドパ配合剤の処方例が 1 例であった。

### 3. 認知症治療薬と向精神薬の等価換算値

抗精神病薬の CP 換算値および睡眠薬の DAP 換算値について、認知症治療薬の処方状況別に分類したものを図 1-4 に示す。睡眠薬投与量については、ChEI 単剤群は処方なし群および MEM 単剤群に対して多重比較検定の結果、有意に高い値を示した。また、MEM 単剤群と処方なし群の間に有意差は得られなかったが、MEM 単剤群の方が処方なし群よりも睡眠薬の投与量は低い値を示していた。抗精神病薬の投与量については認知治療薬のそれぞれの分類群間に有意な差は認められなかった。

## － 考 察 －

ChEI、MEM と向精神薬の適正使用状況を評価する上で、重篤な有害事象の有無を確認するために、身体機能について評価を行った。今回の調査では、認知症治療薬の投与の有無や向精神薬の投与量に関係なく、ChEI で指摘されている徐脈や血圧上昇、薬剤によると考えられる肝機能異常については認められなかった。また、MEM の慎重投与に該当する腎機能障害については、リスクがあると考えられた患者が MEM 単剤群で 1 例、ChEI・MEM 併用群で 1 例みられたが、CKD 診療ガイド 2012 で 70 歳以上の患者で腎臓専門医への紹介が望ましいとされている基準である、eGFR 40 mL/分/1.73 m<sup>2</sup>未滿となる患者はみられなかった。これらのことは、認知症治療薬による重篤な循環器や肝・腎機能に関する副作用は発現していなかったことを示していると考えられた。

併用されている向精神薬については、気分安定薬が 11 例、抗うつ薬であるトラゾドンやミルタザピンが 9 例に併用されていた。バルプロ酸ナトリウムやカルバマゼピンは焦燥性興奮に対して必要な場合には投与を考慮してもよいとされている<sup>4)</sup>ことから抗精神病薬の減量を、トラゾドンやミルタザピンは催眠作用を有する抗うつ薬であることから睡眠薬の減量を目的として併用されているものと考えられた。また、抗不安薬は、75 歳以上の高齢者、中等度以上の認知症患者には有害事象が発現しやすく、認知機能低下のリスクがあること<sup>4)</sup>、抗パーキンソン薬のビペリデンは ChEI 単剤群で併用されているが、抗コリン作用を有する薬剤と ChEI はそれぞれの効果を減弱させる可能性があるため併用注意となっていることは、抗不安薬やビペリデンの併用が少なかった理由の一つであると考えられた。

そのような中で、ChEI については、睡眠薬の処方率は他の群よりも有意に高く、睡眠薬の DAP 換算値は処方なし群及び MEM 単剤群よりも有意に高い値を示していた。併用されている抗精神病薬において、アリピプラゾールやブロナンセリンなどの非鎮静系の抗精神病薬よりも鎮静系抗精神病薬であるクエチアピンの処方率が高く、アリピプラゾール処方例の 5 例中 4 例にクエチアピンが併用されていたこと、睡眠薬の DAP 換算値は  $\gamma$ -アミノ酪酸 (Gamma Amino Butyric Acid : GABA) 受容体に作用する BZD 系および非 BZD 系睡眠薬の換算値であること、*in vitro* ではあるが ChEI によるドパミンの分泌促進作用について報告されている<sup>13)</sup>ことを考慮すると、ChEI によって中枢神経系が、幻覚・妄想などの精神病症状が過度に誘発されるまでではないが興奮した結果、睡眠薬の処方率や DAP 換算値の増加につながったものと推察された。

MEM 単剤群では、スボレキサントやラメルテオンの処方率が他の群よりも有意に高く、BZD 系睡眠薬の処方率は他の群よりも有意に低かったこと、DAP 換算値は服用なし群と

有意差がなかったことから、MEM の鎮静効果から睡眠薬の投与量増加の抑制につながったものと考えられた。

ChEI・MEM 併用群において、チアプリドの処方率は有意に高かったものの、抗精神病薬の処方率および投与量、睡眠薬の処方率および投与量は、処方なし群および ChEI 単剤群のいずれよりも低い値を示していた。MEM による鎮静効果や DNP と MEM の併用による ADL の改善効果についてはすでに報告されている<sup>4,5)</sup>ことから、ChEI と MEM を併用することによって、MEM 単剤で用いるよりも睡眠薬の減量につながる可能性が示唆された。ただし、今回の調査では ChEI・MEM 併用群は 6 例であり、今後、例数を増やした上で再現性の検証が必要と考える。

本研究において、ChEI 単剤群では睡眠薬の投与量が他の群よりも有意に高いこと、MEM 単剤投与群で睡眠薬の投与量や処方率が低下していたことから、ChEI が中枢神経の興奮性を高め、MEM が鎮静・静穏作用を示すことが示唆された。ChEI による興奮、不眠などの活動性亢進や MEM の焦燥、攻撃性に対する鎮静効果については、「かかりつけ医のための BPSD に対する向精神薬使用ガイドライン（第 2 版）」<sup>4)</sup>にも記載されており、本研究の結果を支持するものであると考えられた。また、宮村ら<sup>14)</sup>は、向精神薬が BPSD の悪化関連する可能性を示唆した上で、認知症発症以前からの精神症状に対して処方された場合と比べて、BPSD の治療のために処方された場合において、睡眠薬が BPSD の悪化関連要因となる事例が 5%水準で有意に多く、抗精神病薬は、BPSD の治療のために処方されていた患者の 56.0 %でかえって BPSD の悪化関連要因となっていたと報告している。このことと今回の結果から、ChEI や MEM を有効に用いることは、抗精神病薬や睡眠薬の投与量の減量を可能とし、抗精神病薬や睡眠薬の有害事象や BPSD の悪化防止につながるものと考えられた。

ただし、本研究では認知症の中核症状および BPSD の症状変化については直接的に評価していないことから、認知症治療薬の効果を論じるには限界がある。また、本研究は一施設の入院患者のみを対象としていること、ChEI は 12 例中 11 例が DNP であることを考慮すると、本研究の結果の普遍性の検討および GAL や RIV について同様の検討を行うには、複数の施設で調査例数を増加し、同様の検討を実施する必要があると考えられた。

精神科薬物療法において、抗精神病薬や睡眠薬などの向精神薬は使用頻度が高く、精神科に関わる薬剤師にとって投与後の有害事象を予測しやすい薬剤群の一つである。このことは向精神薬を適正に用いる上で重要なことではあるが、同時にこれらの薬剤の使用に寛容な一面となることとも考えられる。そのような中で、ChEI や MEM の特徴を十分に理解して使用することは認知症治療において重要であると考えられた。

— 第1章 図表 —

表 1-1 処方調査対象者の背景

	対象者平均値 (n=84)	当センターの 検査基準値
年齢 [歳]	80.7 ± 5.9	-
性別 [例] 男性/女性	45/39	-
在院日数 [日]	97.7 ± 44.0	-
体重 [kg]	46.1 ± 8.1	-
脈拍 [/min]	70.4 ± 9.2	-
血圧(収縮期) [mmHg]	122 ± 18	-
血圧(拡張期) [mmHg]	68 ± 10	-
アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST) [IU/L]	18.7 ± 5.6	10 - 35
アラニントランスアミナーゼ(ALT) [IU/L]	15.4 ± 9.3	10 - 35
アルカリフォスファターゼ [IU/L]	258 ± 86	120 - 340
γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP)[IU/L]	19.4 ± 15.7	8 - 60
血清アルブミン [g/dL]	3.6 ± 0.4	4.1 - 5.3
血清尿素窒素(BUN) [mg/dL]	17.7 ± 8.5	9 - 22
血清カリウム [mEq/L]	4.0 ± 0.5	3.4 - 4.7
推算糸球体濾過量(eGFR) [mL/min/1.73m <sup>2</sup> ]	65.5 ± 17.1	-
血清クレアチニン [mg/dL]	男性 0.95 ± 0.49 女性 0.69 ± 0.11	男性 0.5 - 1.1 女性 0.4 - 0.8
クレアチニンクリアランス (予測値) <sup>a)</sup> [mL/min]	45.6 ± 14.5	-

平均値 ± 標準偏差

\*: コッククロフトの式で計算

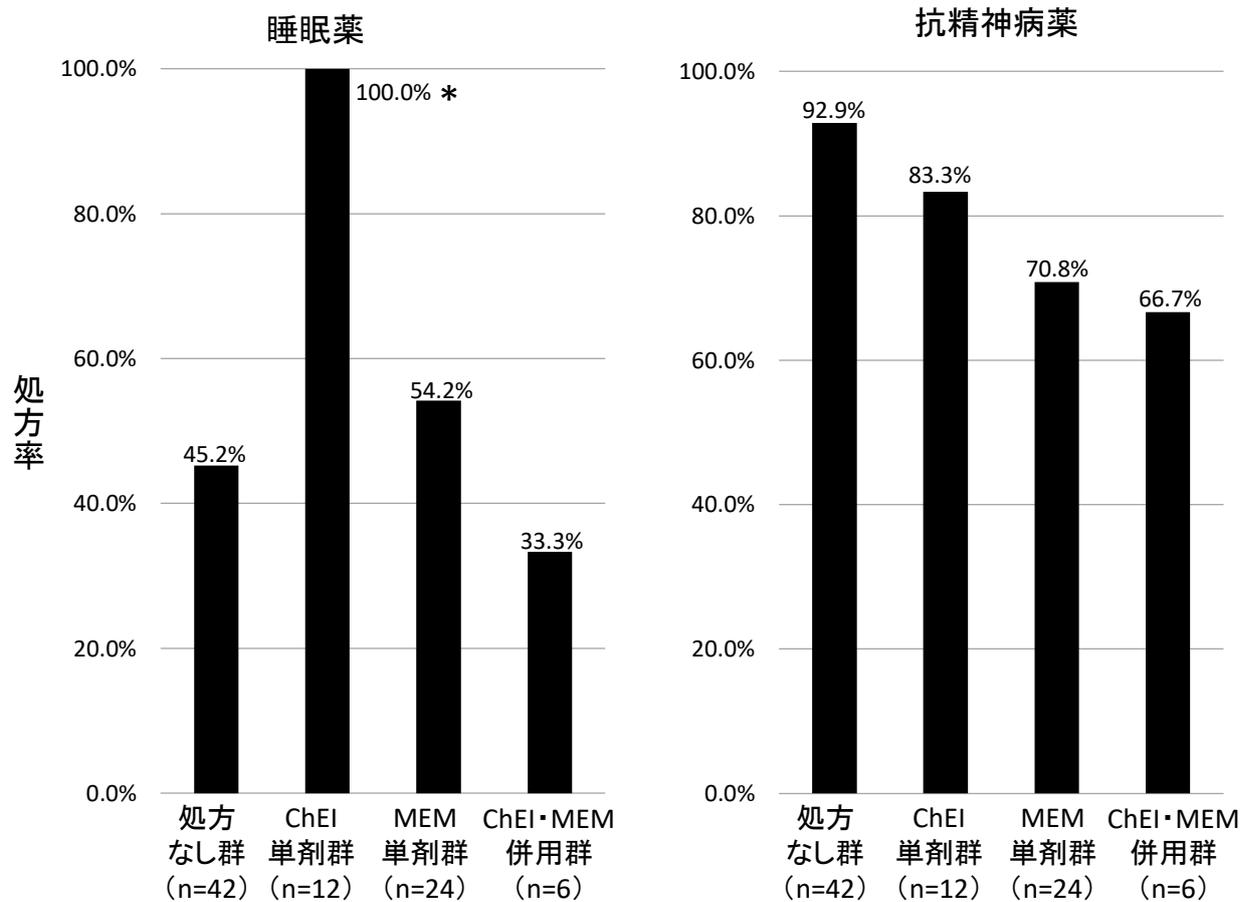


図 1-1 併用されていた睡眠薬と抗精神病薬の処方率

グラフ内の数字は処方率を示す。

$\chi^2$  検定 \* :  $p < 0.05$

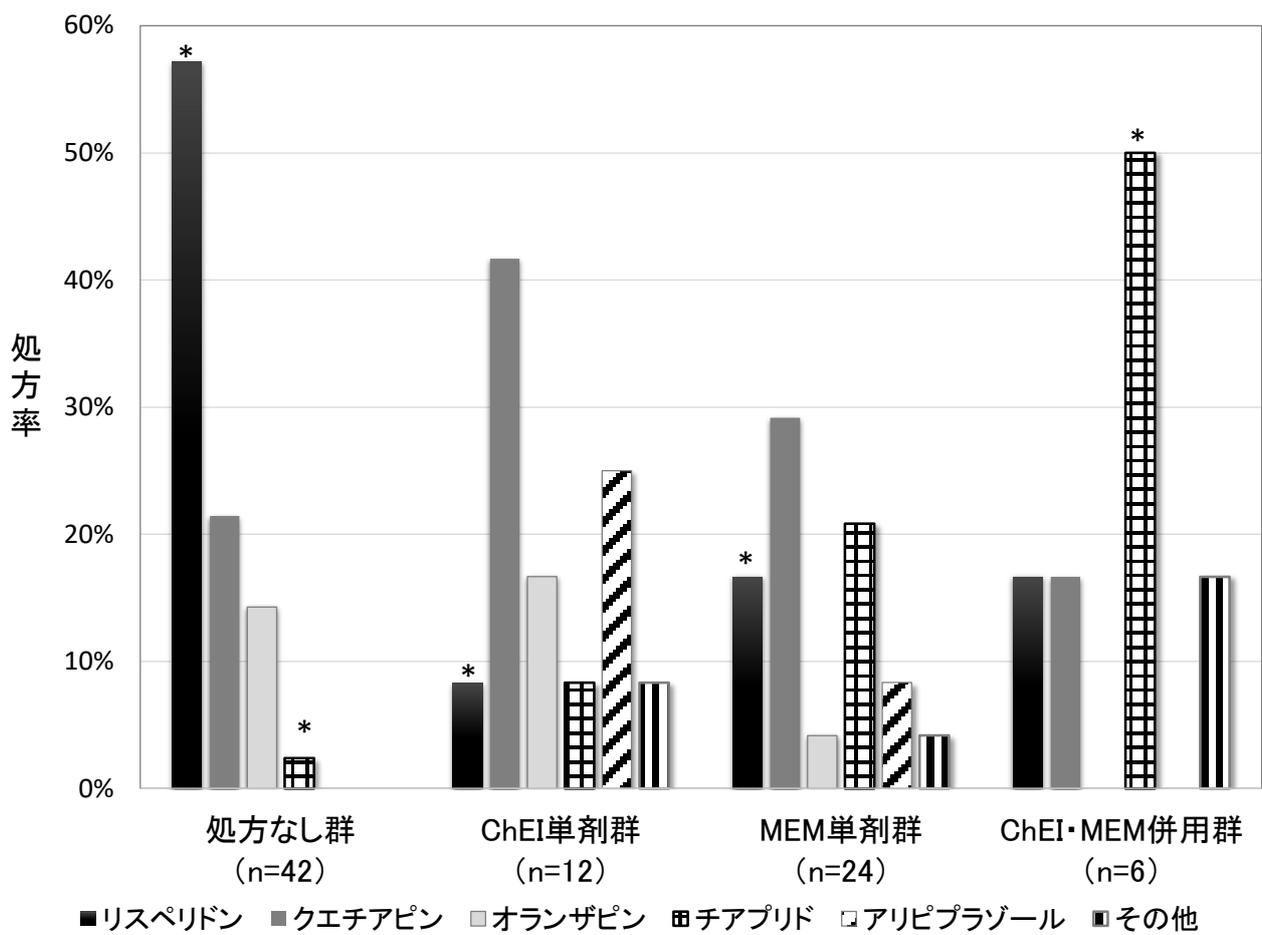


図 1-2 併用されていた抗精神病薬の種類と処方率

$\chi^2$  検定    \*:  $p < 0.05$

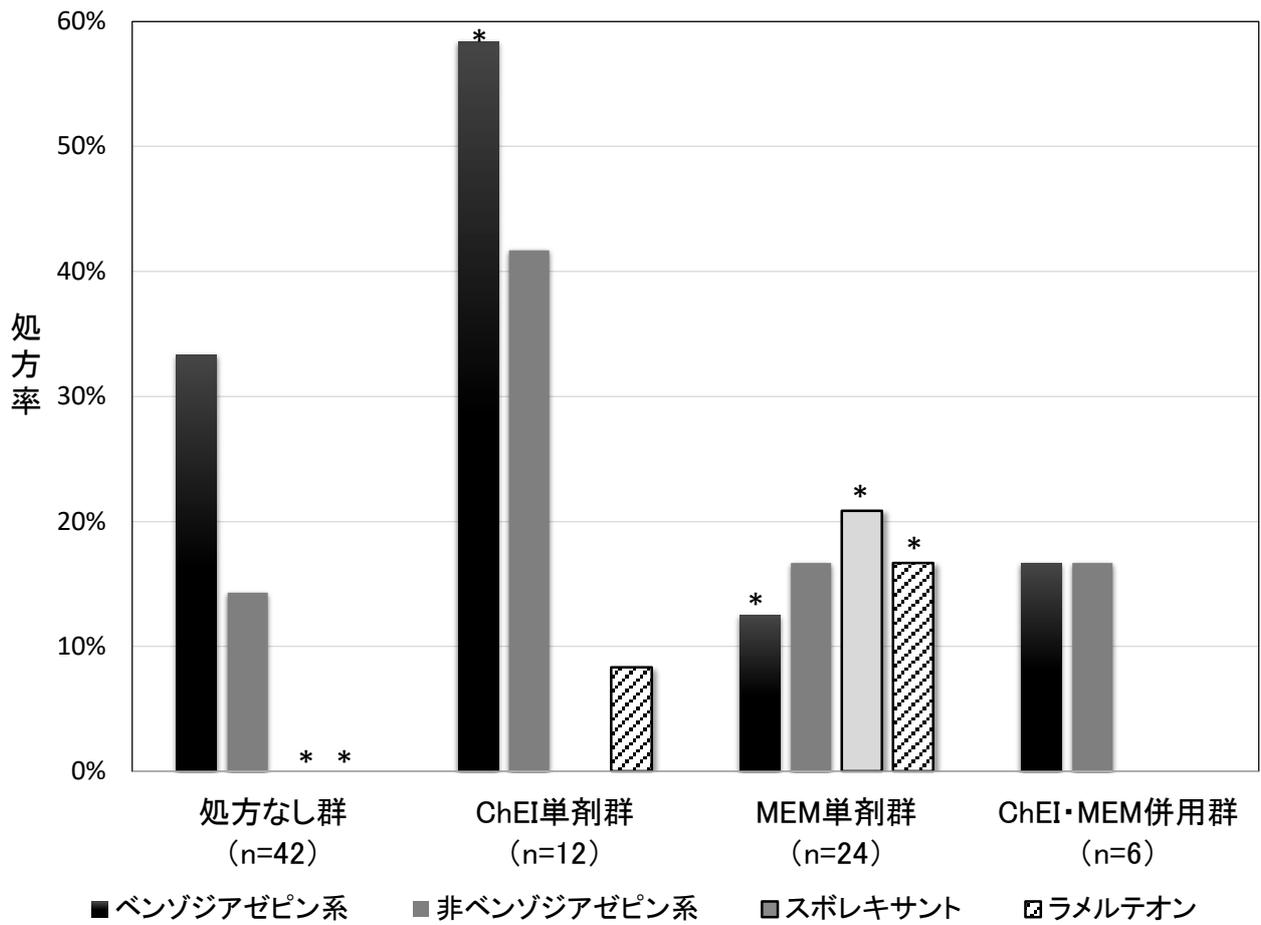


図 1-3 併用されていた睡眠薬の種類と処方率

$\chi^2$  検定 \* :  $p < 0.05$

表 1-2 治療薬の処方患者数および処方率

	併用薬	処方患者数 [例]	処方なし群 (n=42)	ChEI単剤群 (n=12)	MEM単剤群 (n=24)	ChEI・MEM 併用群 (n=6)
中枢神経系用薬	抗うつ薬	13	14.3%	33.3%	12.5%	-
	気分安定薬	11	4.8%	16.7%	25.0%	16.7%
	抗不安薬	3	-	8.3%	4.2%	16.7%
	抗パーキンソン薬	5	-	36.4%	-	20.0%
循環器用薬	血圧降下剤	20	21.4%	8.3%	33.3%	33.3%
	血管拡張剤	25	28.6%	33.3%	29.2%	33.3%
	抗血液凝固剤	14	11.9%	8.3%	20.8%	50.0%
	利尿剤	5	4.8%	-	12.5%	-
緩下剤	酸化マグネシウム	21	23.8%	16.7%	29.2%	33.3%
	センノシド	8	2.4%	16.7%	16.7%	16.7%
	泌尿器官用剤	10	9.5%	8.3%	12.5%	33.3%
	糖尿病治療薬	12	16.7%	8.3%	8.3%	33.3%

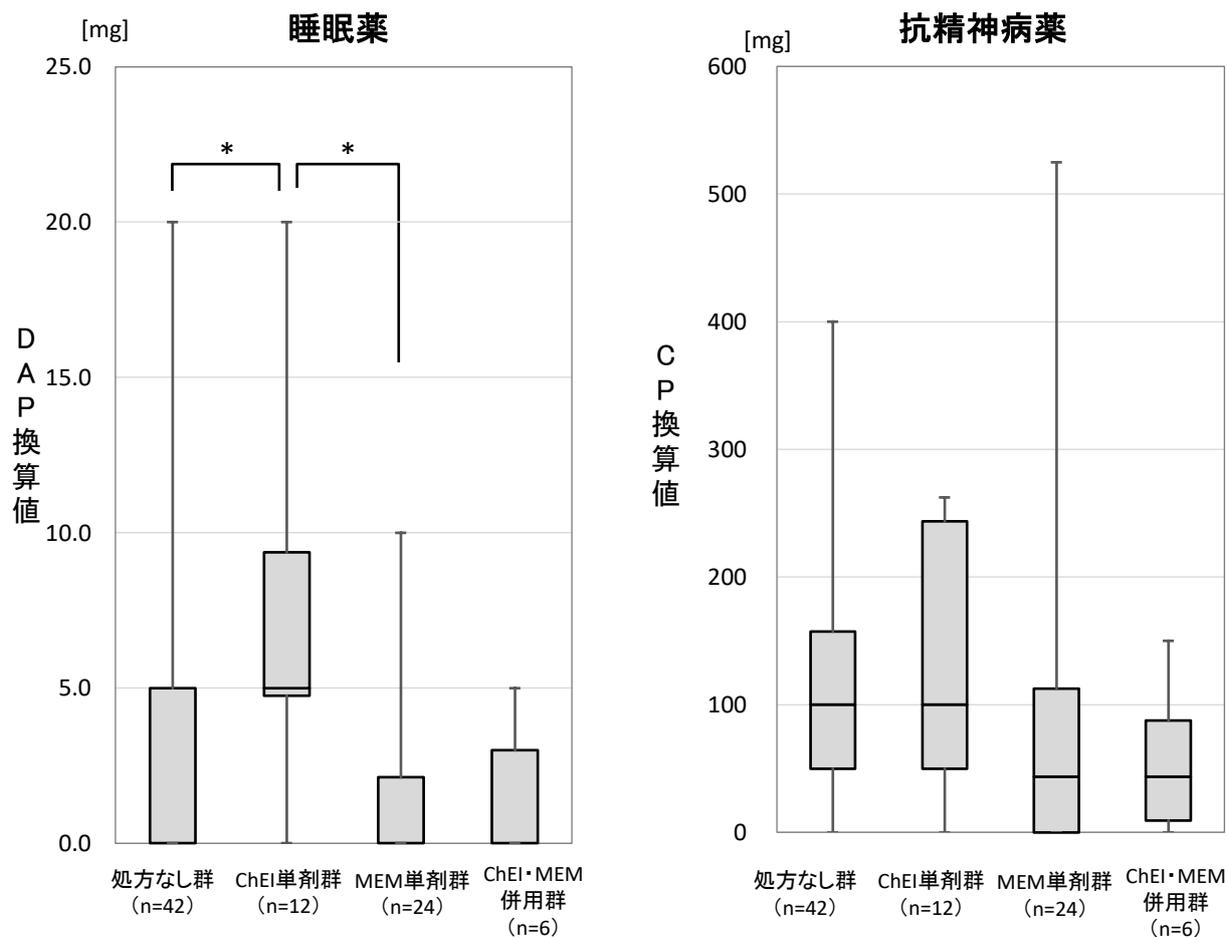


図 1-4 抗精神病薬と睡眠薬の処方量

BZD 系および非 BZD 系睡眠薬は DAP に、抗精神病薬は CP に換算し、これらの投与量を認知症治療薬の処方状況別に比較検討した。

CP:クロルプロマジン DAP : ジアゼパム

Steel-Dwass \* :  $p < 0.05$

## 第2章 DNP および MEM のマウスの行動および睡眠への影響

第1章の処方調査の結果では、ChEIについては、睡眠薬の処方率は他の群よりも有意に高く、睡眠薬のDAP換算値は処方なし群およびMEM単剤群よりも有意に高い値を示していた。また、併用されている抗精神病薬において、鎮静系抗精神病薬であるクエチアピンの処方率が高かったこと、睡眠薬のDAP換算値はGABA受容体に作用するBZD系および非BZD系睡眠薬の換算値であることなどを考慮すると、ChEIによって中枢神経系が、幻覚・妄想などの精神病症状が過度に誘発されるまでではないが興奮した結果、睡眠薬の処方率やDAP換算値の増加につながったものと推察された。

MEM単剤群では、スボレキサントやラメルテオンの処方率が他の群よりも有意に高く、BZD系睡眠薬の処方率は他の群よりも有意に低かったこと、DAP換算値は服用なし群と有意差がなかったことなどから、MEMの鎮静効果から睡眠薬の投与量増加の抑制につながったものと考えられた。また、処方調査の対象となったAD患者に処方されていたChEIは、ほとんどがDNPであったことを考慮すると、処方調査結果からの考察を検証するためには、より単純な実験系においてDNPおよびMEMの精神症状への影響を検討する必要がある。

第2章では第1章のAD患者の処方調査結果から得られた考察にあるDNPおよびMEMの行動への影響について、マウスの自発運動およびペントバルビタール誘発睡眠による行動薬理学的実験を用いて検証した。

### — 実験手順 —

#### 1. 試薬および材料

DNP および MEM は、東京化成工業株式会社（東京、日本）から購入した。また、ペントバルビタールナトリウムはナカライテスク株式会社（京都、日本）から購入した。日本薬局方生理食塩液（生理食塩液）は大塚製薬工場製（徳島、日本）を用いた。マウスに投与するDNP および MEM 溶液は、DNP は 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1 mg/mL、MEM は 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 mg/mL の濃度となるように生理食塩液に溶解し、調製した。また、ペントバルビタール溶液は、ペントバルビタールナトリウムを 4.5 mg/mL となるように生理食塩

液に溶解し、調製した。マウスは ddY 系雄性マウス（4 週齢）を用いた。

## 2. DNP および MEM による自発運動に対する影響

マウスをそれぞれ別のケージに入れ 15 分間馴化させたのちに、DNP または MEM 標準溶液を 10 mL/kg で腹腔内に投与した。また、コントロールには体重の 1% (v/w) となる生理食塩液を腹腔内投与した。その後、投与後 30 分間の移所運動量を測定した。移所運動量の測定には近赤外線ビームセンサーによる運動量測定装置（マウス用ロコモセンサー LS-5：メルクエスト、富山、日本）を用いた。

## 3. DNP および MEM によるペントバルビタール誘発睡眠に対する影響

マウスをそれぞれ別のケージに入れ 10 分間馴化させたのちに、DNP または MEM 標準溶液を 10 mL/kg で腹腔内に投与した。また、コントロールには体重の 1% (v/w) となる生理食塩液を腹腔内投与した。投与 10 分後にペントバルビタール溶液を 10 mL/kg で腹腔内に投与し、正向反射が消失するまでの時間を睡眠潜時として、正向反射が消失してから回復するまでの時間を睡眠時間として測定した。

## 4. 統計学的解析

DNP および MEM 投与各群とコントロール群との比較には正規性を確認した上で、ステューデントの t 検定を用いた。各群間における有意検定には、分散分析を用いて有意差があった項目についてテューキー・クレーマー 法を用いて検定を行った。

いずれの検定においても統計ソフトは SPSS version 20 (IBM 社製) を用いた。

# － 結 果 －

## 1. DNP および MEM による自発運動に対する影響

DNP、MEM を腹腔内投与後の自発運動を確認した (図 2-1)。その結果、DNP 投与群では、0.01 mg/kg 投与群における移所運動量 ( $373 \pm 95$  カウント：平均値 $\pm$ 標準偏差) はコントロール群 ( $256 \pm 76$  カウント) よりも 1%水準で有意に増加しており、1.46 倍であった。また、1 mg/kg 投与群 ( $238 \pm 94$  カウント) は 0.01 mg/kg 投与群よりも 5%水準で有意に低下していた。

MEM 投与群では、10 mg/kg 投与群における移所運動量 ( $783 \pm 458$  カウント) はコン

トロール群 (318 ± 115 カウント) よりも 1%水準で有意に増加しており、1 mg/kg 投与群における移所運動量 (400 ± 125 カウント) はコントロール群よりも 5%水準で有意に増加していた。また、10 mg/kg 投与群における移所運動量は全ての群よりも 1%水準で有意に増加していた。

## 2. DNP および MEM によるペントバルビタール誘発睡眠に対する影響

DNP、MEM を腹腔内投与後のペントバルビタール誘発睡眠を確認したところ、睡眠潜時において、DNP 投与群では、0.03 mg/kg 投与群における睡眠潜時はコントロール群よりも 5%水準で有意に延長していた。また、0.03 mg/kg 投与群は 0.01, 0.3, 1 およびコントロール群よりも 5%水準で有意に延長していた。MEM 投与群では有意差は認められなかった (図 2-2)。

また、睡眠時間については、DNP 投与群では 1 mg/kg 投与群で 0.01, 0.3 mg/kg 投与群よりも 5%水準で有意に延長していた。MEM 投与群については、0.3, 1, 3 mg/kg 群でコントロール群に対して延長傾向がみられたが、有意差は認められなかった (図 2-3)。

### — 考 察 —

DNP 0.01 mg/kg 投与群において自発運動の亢進が確認できた。これについては、第 1 章における ChEI による中枢神経系の軽度な興奮の可能性を支持するものと考えられる。また、1 mg/kg 投与群が 0.01 mg/kg 投与群よりも有意に運動量が低かったことについては、DNP をマウスに静脈内投与した時の ED<sub>50</sub> 値は雄で 3.7 mg/kg であり、投与直後或いは数分後から自発運動の減少が報告されている<sup>15)</sup>ことを考慮すると、DNP 1 mg/kg 投与群では、DNP の毒性が出現してきており、その結果、運動量の低下につながっているものと推察された。また、MEM は開発当初、ドパミン遊離作用を示すことから<sup>16)</sup>、1982 年にはドイツでパーキンソン症候群、脳機能障害および脳・脊髄性痙直等の適応が承認されている。ラットの脳皮質および線条体におけるドパミン放出に対して 5, 10, 20 mg/kg の MEM 溶液を腹腔内投与した場合、ドパミン放出の用量依存的増加が報告されており<sup>16)</sup>、MEM 1mg および 10 mg 投与群で自発運動量の増加がみられたことについては、ドパミン分泌の増加が関連しているものと考えられた。

ペントバルビタール誘発睡眠について、0.03 mg/kg DNP 投与群においてコントロール群, 0.3, 1, 3 mg/kg 投与群に対して睡眠潜時の有意な延長が確認された。*in vitro* において DNP

濃度が 100 nmol/L の時に線条体のドパミン分泌を  $20 \pm 3\%$  促進し、これをピークに 10  $\mu\text{mol/L}$  では  $60 \pm 3\%$  のドパミン分泌を抑制していることから<sup>13)</sup>、0.03 mg/kg (約 80 nmol/kg) DNP で睡眠潜時の延長につながったものと考えられた。このことに関しては、第 1 章の ChEI 処方群では睡眠薬の処方率は他の群よりも有意に高く、睡眠薬の DAP 換算値は処方なし群よりも有意に高い値を示していたことを支持しているものと考えられた。また、1 mg/kg DNP 投与群は 0.01, 0.3 mg/kg DNP 投与群に対して睡眠時間の有意な延長が確認された。DNP は 0.01 mg/kg 投与時にコントロール群よりも自発運動が増加していたことから、コントロール群よりも睡眠潜時の延長が考えられ、1 mg/kg 投与では毒性発現の影響によって自発運動の低下がみられたことから、睡眠潜時の短縮が考えられた。これらのことから、1 mg/kg 投与群と 0.01 mg/kg 投与群との睡眠時間の差につながったものと考えられた。しかし、DNP の睡眠時間に対する影響はコントロール群と有意な差は示さなかったことから、DNP は睡眠時間の短縮にほとんど影響しないものと考えられた。

MEM については睡眠潜時、睡眠時間ともにコントロール群と有意な差はみられなかった。しかし、臨床では BPSD への対症治療薬として投与されることも多い。投与 12 週目および 24/28 週目の認知症患者の精神症状評価尺度 (The Neuropsychiatric Inventory: NPI) の合計スコアの推移はプラセボ群に対して有意な改善を示し、投与 12 週目の NPI の下位項目において妄想、幻覚、興奮・攻撃性が MEM の投与で有意に改善されたと報告されており<sup>17)</sup> 「かかりつけ医のための BPSD に対応する向精神薬使用ガイドライン (第 2 版)」でも BPSD の幻覚、妄想、焦燥、攻撃性に対しては非薬物的介入を最優先するが、薬物的介入が必要な場合には MEM の使用をまず検討することとしている<sup>4)</sup>。ただし、AD の精神症状は神経原繊維変化量との関連が指摘されていること、興奮や異常行動などの症状が眼窩前頭皮質の神経原繊維変化量と相関するとの報告から、正常マウスを用いたペントバルビタール誘発睡眠では第 1 章における MEM の鎮静効果から睡眠薬の投与量増加の抑制の可能性を直接示すことは困難であった可能性が考えられた。

第 2 章の結果は、第 1 章における ChEI 処方群では睡眠薬の処方率は他の群よりも有意に高く、睡眠薬の DAP 換算値は処方なし群よりも有意に高い値を示していたことや ChEI による中枢神経系の軽度な興奮の可能性を支持するものと考えられた。しかし、70 歳以上の男性の平均体重は 60.7 kg、女性の平均体重は 50.1 kg<sup>18)</sup>であることを考慮すると、DNP 5 mg を内服した場合、0.08 から 0.1 mg/kg に該当することから、マウスとヒトとの生理機能の違い等を考慮する上でも薬物血中濃度を測定することは重要なことであると考えられた。

— 第2章 図表 —

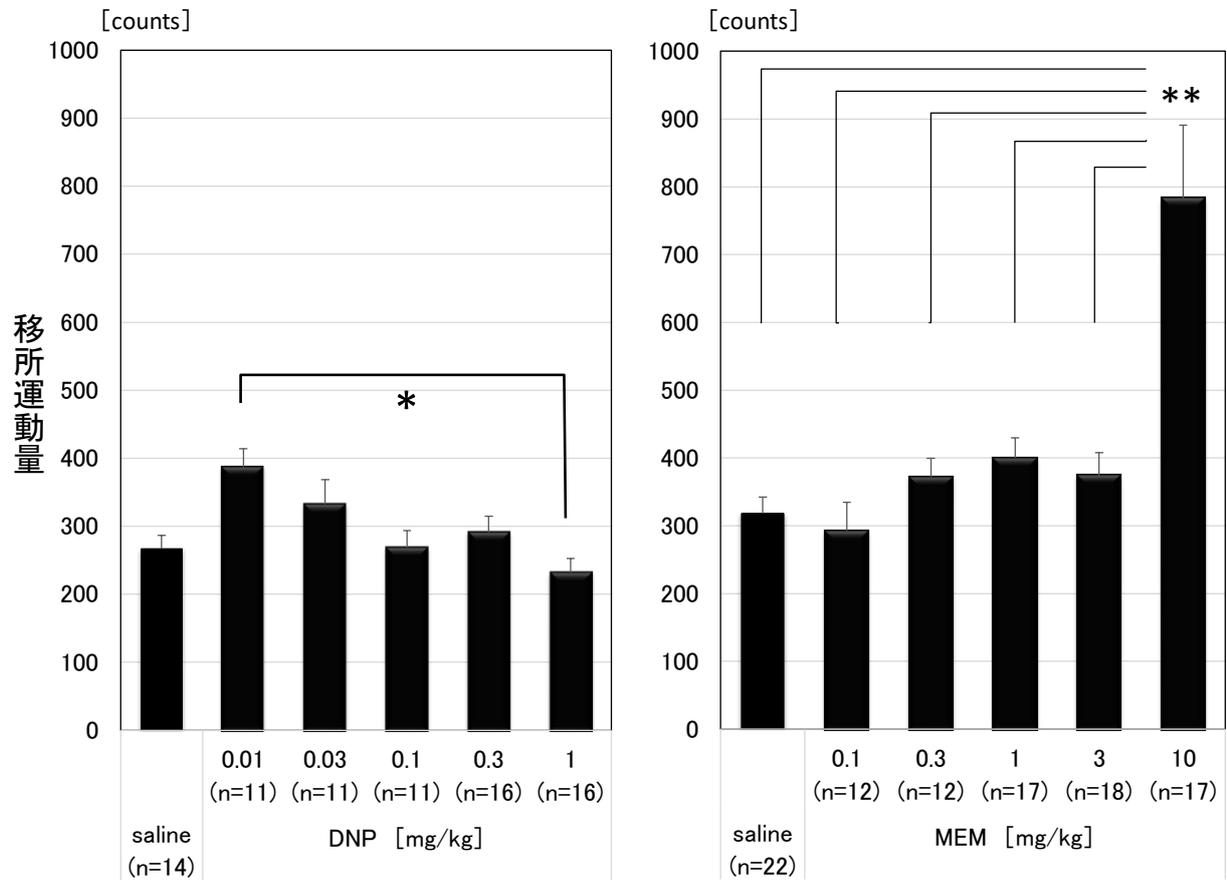


図 2-1 自発運動に対する DNP と MEM の影響

ddY 系雄性マウスに対して、DNP を 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 mg/kg、MEM を 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg となるように腹腔内に投与し、その後 30 分間の移所運動量を測定した。

Tukey-kramer \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$

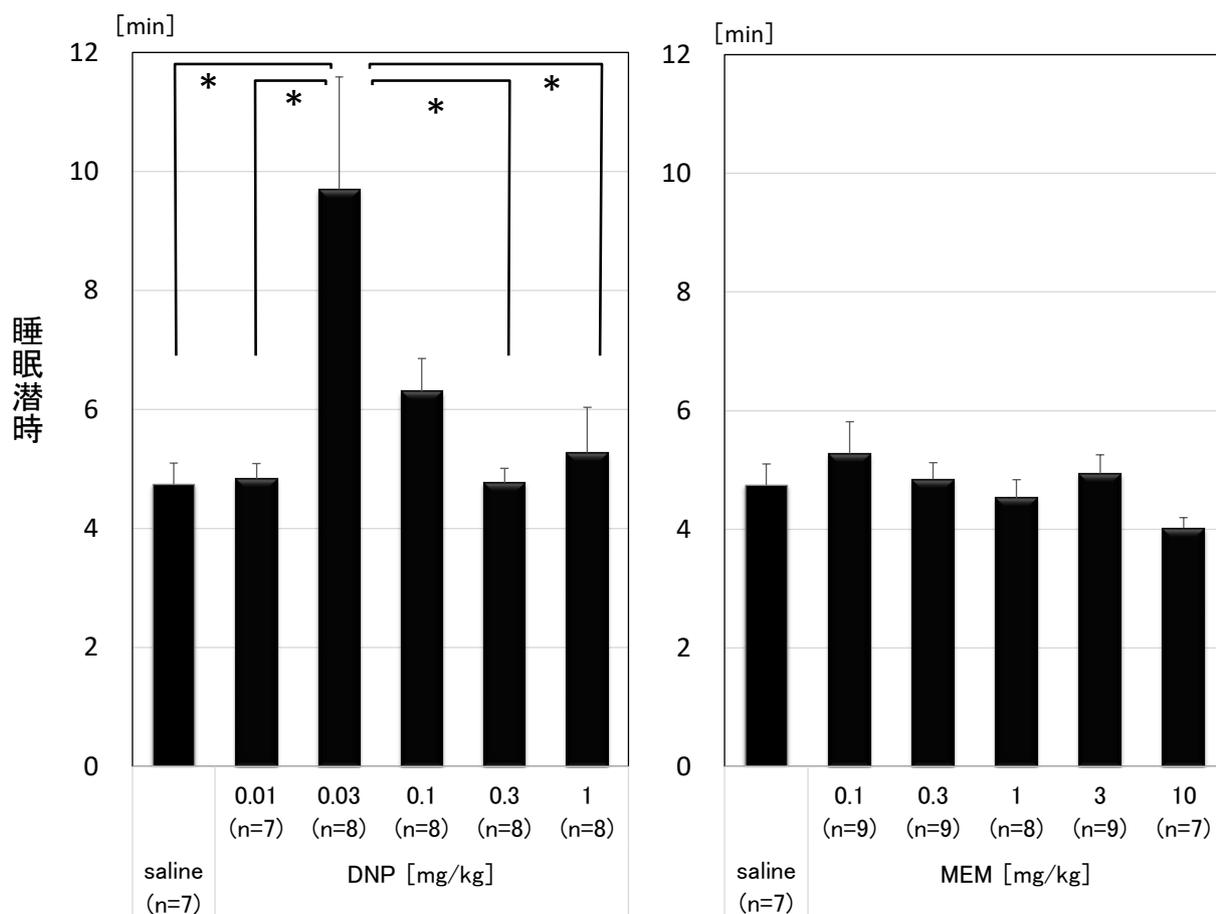


図 2-2 ペントバルビタール誘発睡眠（睡眠潜時）に対する DNP と MEM の影響

ddY 系雄性マウスに対して、DNP を 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 mg/kg、MEM を 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg となるように腹腔内に投与し、10 分間馴化させた後に、ペントバルビタール溶液を 45 mg/kg となるように腹腔内に投与した。その後、正向反射が消失するまでの時間を計測した。

Tukey-kramer \* :  $p < 0.05$

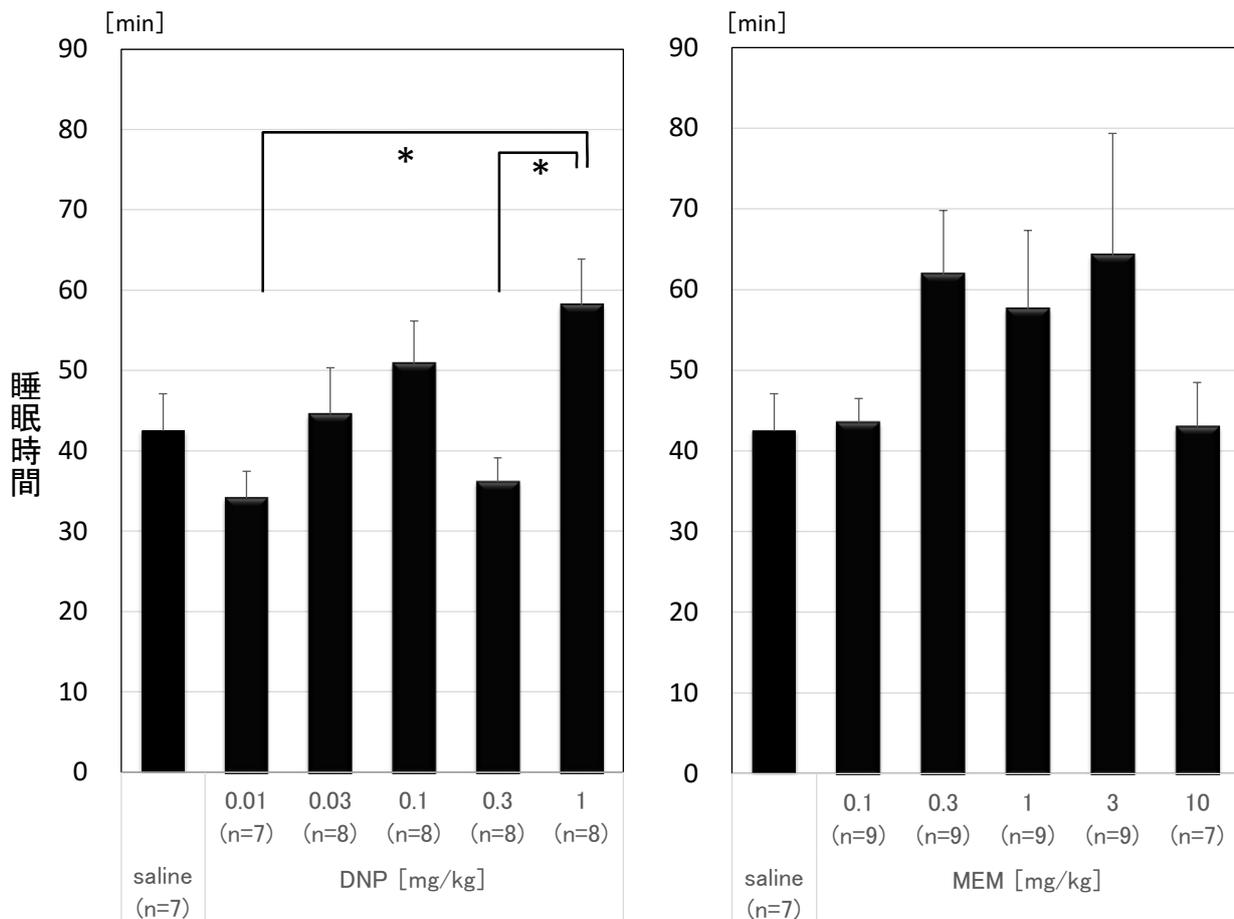


図 2-3 ペントバルビタール誘発睡眠（睡眠時間）に対する DNP と MEM の影響

ddY 系雄性マウスに対して、DNP を 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 mg/kg、MEM を 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg となるように腹腔内に投与し、10 分間馴化させた後に、ペントバルビタール溶液を 45 mg/kg となるように腹腔内に投与した。その後、正向反射が消失してから回復するまでの時間を計測した。

Tukey-kramer \* :  $p < 0.05$

### 第3章 ドネペジル・メマンチン同時 LC/MS/MS 分析法の開発

1999年に日本でADの中核症状に対する治療薬としてDNPが承認されて以来、15年以上が経過している。現在、ChEI (DNP、GAL、RIV) およびNMDA受容体アンタゴニスト (MEM) の4種類がADの治療に使用されている。DNPは、最初に承認されたAD治療薬であり、軽度から重度のAD患者に用いられる。またMEMは中等度から重度のAD患者に対して用いられ、作用機序が異なるChEIと併用することが出来る。さらに、これらの2つの薬物の併用療法に関する無作為化比較試験では、認知機能、ADLおよび行動に対する改善効果が示されている<sup>19)</sup>。このことから、MEMとDNPとの併用療法は、しばしば臨床において実践される。DNPまたはMEMの濃度を独立に測定することができる分析法は、これまでに報告されている<sup>20)・30)</sup>。しかしながら、従来の分析システムでは、血清から薬物を抽出する方法が複雑である。臨床応用のためには、抽出操作は単純で迅速に行われなければならない。さらに、採血による侵襲的操作による患者の身体的及び心理的負担を低減するためには、少量の血清しか必要としない分析方法の構築が望まれる。

また、第2章におけるマウスを用いた行動薬理学的研究の結果は、第1章における「ChEI処方群では睡眠薬の処方率は他の群よりも有意に高く、睡眠薬のDAP換算値は処方なし群よりも有意に高い値を示していた」ことや「ChEIによる中枢神経系の軽度な興奮の可能性」を支持するものと考えられた。しかし70歳以上のAD患者が5mgのDNPを内服した場合、平均体重を考慮すると、0.08から0.1mg/kgに該当することから、マウスとヒトとの生理機能の違い等を考慮する上でも薬物血中濃度を測定することは重要なことであると考えられたが、マウスにおけるDNPやMEMの薬物動態についての報告はない。

そこで第3章では、内部標準 (internal standard: IS) としてフェナセチンを用いた液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) を用いて、DNPおよびMEMの血清濃度を同時に測定する簡単で迅速かつ正確な方法の開発について述べる。

## － 実験手順 －

### 1. 試薬および材料

MEM、DNP、フェナセチンは、東京化成工業（東京、日本）から購入した。メタノールとギ酸は、和光純薬工業株式会社（大阪、日本）から購入した。LC/MS/MS分析用LC-MS CHROMASOLV®アセトニトリルは、Sigma-Aldrich（東京、日本）から購入した。超純水は、Elix UV 5（Merck Millipore、Billerica、MA、USA）を備えたMilli-Q® Advantage A10システムを用いて調製した。

DNP、MEMまたはフェナセチンを投与していないddY系雄性マウス（4週齢）から採血した血液を室温で3,000 rpm、15分間遠心分離した後、上清をマウスブランク血清とした。マウスブランク血清は分析まで4℃で保存した。ddY系雄性マウス（4週齢）に0.1 mg/mL DNP/ 0.1 mg/mL MEM生理食塩水溶液を1 mg/kgとなるように経口投与または腹腔内投与した後、5分、10分、15分、20分、30分、45分、60分、90分、120分、180分経過後に、経過時間ごとに別の個体の心臓より採血し、得られた血液を室温で3,000 rpm、15分間遠心分離してマウスサンプル血清を得た。

### 2. 内部標準溶液および混合標準溶液の調製

ISであるフェナセチンを5%メタノール(v/v)含有アセトニトリルに溶解して、5 ng/mLのIS溶液を調製した。DNPおよびMEMをストック溶液として2 mg/mLのメタノールに溶解した。DNPとMEMの各ストック溶液を混合し、5%メタノール(v/v)を含むアセトニトリルで10, 30, 100, 300, 1,000、または3,000 ng/mLに希釈することによりDNP/MEM混合標準溶液を調製した。

### 3. 液体クロマトグラフィー

40℃に保温したTSK-gel ODS-100Vカラム（2.0×50 mm ID、3 μm粒径：東ソー株式会社、東京、日本）を備えた高速液体クロマトグラフィーシステム（Prominence LC-20Aシリーズ：島津、京都、日本）を用いた。移動相には、0.1% (v/v) ギ酸水溶液および0.1% (v/v) ギ酸含有アセトニトリルを用い、流速0.4 mL/分、グラジエントの条件は表3-1とした。LCシステムへの注入から3.0～6.1分後の溶離液を、以下に記載するように質量分析計に導入した。

### 4. MS/MS

測定対象物の迅速な微量定量のために、イオン源としてターボイオンスプレーを備えた

Triple Quad™ 5500 質量分析計 (SCIEX, Framingham, MA, USA) を使用した。Analyst® ソフトウェアプログラム (バージョン 1.5; SCIEX) を使用して LC および MS/MS システムを制御し、クロマトグラムを分析した。すべての測定について、ガス圧、電圧、および温度の条件は次の通りとした (カーテンガス : 30 psi、イオンスプレー電圧 : 5,000 V、ソース温度 : 600 °C、イオン源ガス : 50 psi、イオン源ガス 2 : 80 psi、衝突ガス : 4 psi)。MS/MS による DNP、MEM および IS の検出は、各物質のメタノール溶液 (200 nmol/L) を用いて最適化を行った。それぞれの物質の分離条件の検討には、DNP (100 ng/mL)、MEM (100 ng/mL) および IS (5 ng/mL) からなる 3 µL の混合溶液を LC/MS/MS システムに注入し、表 3-2 に要約されたパラメータにおける陽イオンモードでの多重反応モニタリング (Multiple Reaction Monitoring : MRM) を用いた。

## 5. LC/MS/MS を用いた DNP および MEM のマウス血清濃度の測定および回収率の検討 検量線作成及び LC/MS/MS 分析のサンプル計測に関する手順を図 3-1 に示す。

DNP/MEM 混合標準溶液 5 µL を 45 µL のマウスブランク血清に加え、十分に混合して 1, 3, 10, 30, 100, 300 ng/mL の DNP / MEM 混合マウス標準血清を調製した。20 µL の DNP/MEM 混合マウス標準血清を 180 µL の IS 溶液に添加し、よく混和し、12,000 rpm、4 °C で 3 分間遠心分離した。得られた上清をサンプルバイアルに分注し、LC/MS/MS システムに注入した。マウスサンプル血清中の DNP および MEM の濃度を検量線との比較により計算した。また、予め 45 µL のマウスブランク血清を 180 µL の IS 溶液に添加し、よく混和した後に 10, 30, 100, 300, 1,000 または 3,000 ng/mL の DNP / MEM 混合標準溶液 5 µL を加え、さらによく混和し、12,000 rpm、4 °C で 3 分間遠心分離した。得られた上清をサンプルバイアルに分注し、LC/MS/MS システムに注入し、DNP および MEM の濃度を検量線との比較により計算し、得られた結果から測定に対する回収率を検討した。

## — 結果 —

### 1. LC/MS/MS 分析のための条件の最適化

DNP、MEM および IS のプリカーサーイオンは、それぞれ 380.04, 180.16 および 180.11 Da で決定され、単電荷状態を有していた。図 3-2 に示すように、各プリカーサーイオンから衝突により生成された複数のプロダクトイオンのうち、最も感度が高く特異性の高いプロダクトイオンを選択し、プリカーサー / プロダクトイオンの組み合わせを DNP 380.04 / 90.9 Da、MEM 180.16 / 107.0 Da および IS 180.11 / 110.00 Da とした。自動的に

最適化された他のエネルギーパラメータを表 3-2 に示す。各物質を分離するための LC の勾配条件をこれらの MS/MS のパラメータを用いた MRM 検出下で最適化した結果、表 3-1 に示すグラジエント条件を使用することで、DNP、MEM および IS のピークが重複なく分離することが可能となった (図 3-3)。

## 2. マウス血清中の濃度の測定

得られた MRM クロマトグラムを、Analyst®ソフトウェアプログラムを用いて分析した。1 / x<sup>2</sup> の重み付け係数を有する DNP および MEM の検量線は、良好な直線性を示し (r=0.999 および 0.996)、精度は 1~300 ng/mL の所望の濃度範囲で 12%以内であった。また、DNP および MEM の回収率は 88 から 103 %の範囲内であった (表 3-3)。

DNP および MEM を経口または腹腔内投与したマウスの DNP および MEM の血清濃度を得られた検量線を用いて決定した (図 3-4)。この結果から得られたマウスにおける各薬剤のパラメータを表 3-4 に示す。

## — 考 察 —

臨床において、薬物の血中濃度をモニタリングすることは、薬物の効果を最大にし、副作用のリスクを最小限に抑える最も有効な手段の 1 つである。認知症治療薬の中で DNP と MEN は多く処方されており、同時に処方されることもある。したがって、適切な臨床用量を決定するために臨床診療における DNP および MEM の血清濃度を測定するための簡単な分析方法が望まれる。DNP や MEM を服用している患者は高齢者がほとんどであることから、これらの薬剤以外にも多くの薬剤を服用している可能性が高い。このような中で MRM を用いた LC/MS/MS 定量化は、多くの薬物の中で DNP および MEM のみを同時にかつ特異的に定量する最も有効な方法であると考えられる。

また、本研究で IS として用いたフェナセチンは、現在、日本では承認されておらず、測定の対象となる患者が服用している可能性を考慮する必要性がほとんどない。さらに、一般的な ODS カラムおよびグラジエントを用いた HPLC によって、フェナセチンを DNP および MEM から分離することが出来た。これらのことより、フェナセチンは、LC/MS/MS 分析において安定した分析値を示し、内部標準として適切な物質であった。

DNP の吸収に関しては、食事の影響をほとんど受けないことが知られている<sup>31)</sup>。また、ラットに <sup>14</sup>C-ドネペジル塩酸塩 (1 mg/kg) を単回経口投与した場合、速やかに吸収され (吸収率は 95 %以上)、経口投与(1 mg/kg)後の平均血液中放射能濃度は投与後 30 分に

$C_{max}$ ( $61.1 \pm 6.26$  ng/mL, 平均値  $\pm$  標準誤差)に達したとの報告がある<sup>32)</sup>。DNP の pKa は約 8.9 であり、1-オクタノール/水系緩衝液 (pH6.5) における分配係数は 1,000 以上であることから、脂溶性が高く、消化管からの吸収は良好であるが、腹腔内投与では薬物は腸管組織を経ずに門脈血流中に吸収されるため、肝臓での初回通過代謝のみが問題となる。本研究では DNP では、腹腔内投与に比べて経口投与では血清中濃度の上昇は確認できなかった。本研究におけるマウスの  $T_{max}$  はラットと比較してほとんど差がないことから、ddY 系雄性マウスでは DNP の消化管からの吸収過程に血清中濃度上昇を抑制する要因があることと CYP3A4, 2D6 の代謝機能が亢進している可能性が示唆された。

MEM については、 $T_{max}$  が腹腔内投与で 20 分、経口投与で 45 分と DNP よりも長くなっていた。MEM の pKa は約 10.6 であり、1-オクタノール/水系緩衝液 (pH 7) における分配係数は 2.09 であることから、脂溶性と水溶性の中間からやや脂溶性が強い<sup>33)</sup>。MEM のヒト血漿蛋白結合率は 41.9 ~ 45.3% と高い値ではないにもかかわらず、分布容積が 592.5 ~ 703.8 L であること<sup>33)</sup>を考慮すると脳内のみならず各組織への移行度が高い可能性が考えられ、その結果、 $T_{max}$  と  $t_{1/2}$  の延長につながったものと考えられた。このことから、MEM の血清中濃度は AD 患者の体重や筋肉・脂肪量などに影響される可能性が示唆された。

本研究によって得られたマウスにおける DNP と MEM の血清中濃度の推移から、第 2 章でマウスに DNP 0.03 mg/kg を腹腔内投与した時の睡眠潜時における DNP の血清中濃度は 0.7 から 1 ng/mL と推定された。また、睡眠時間の延長傾向がみられた MEM 1 mg/kg 投与時の MEM 血清中濃度は 50 から 78 ng/mL であった。

本研究では、マウス血清中の DNP および MEM の薬物濃度の同時高速微量定量が、LC/MS/MS を用いて可能であることを示した。この方法を使用した測定は非常に簡単で、内部標準を含む混合有機溶媒による脱タンパクのみで、血清濃度を簡単に測定することができ、測定時間が大幅に短縮することが出来た。また、各化合物の検量線は、血清中の実際の薬物濃度の範囲内で良好な直線性を示した。このような簡単な処置にもかかわらず、マウス血清サンプルからの薬物回収は十分であり、その変動性は 12 % 以内であった。これらのことから、第 3 章で確立された血清中濃度測定法はヒトにも応用可能であると考えられた。

— 第3章 図表 —

表 3-1 LC の流速およびグラジエント条件

計測時間 [min]	流量 [mL/min]	A液 [%]	B液 [%]
0.0	0.4	95	5
0.5	0.4	95	5
4.0	0.4	60	40
4.5	0.4	5	95
5.0	0.4	5	95
5.1	0.4	95	5
7.0	0.4	95	5

固定相には、40°Cに保温した TSK-gel ODS-100V カラム (2.0×50mm ID、3 $\mu$ m 粒径 : 東ソー株式会社 (東京、日本)) を用い、移動相 A : 0.1% ギ酸/H<sub>2</sub>O 移動相 B : 0.1% ギ酸/アセトニトリルを用いた。

表 3-2 タンデム質量分析計の分析共通パラメータ

	プリカーサー イオン [Da]	プロダクト イオン [Da]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	EP [V]	Dwell [msec]
DNP	380.04	90.90	216	71	12	10	200
MEM	180.16	107.00	81	33	14	10	200
IS	180.11	110.00	26	30	13	10	200

DP: デクラスタリング電位      CE: コリジョンエネルギー

CXP: コリジョンセルイグジット電位

EP: エントランス電位      Dwell : データ取り込み時間

20 $\mu$ L DNP/MEM 混合マウス標準血清 または マウスサンプル血清

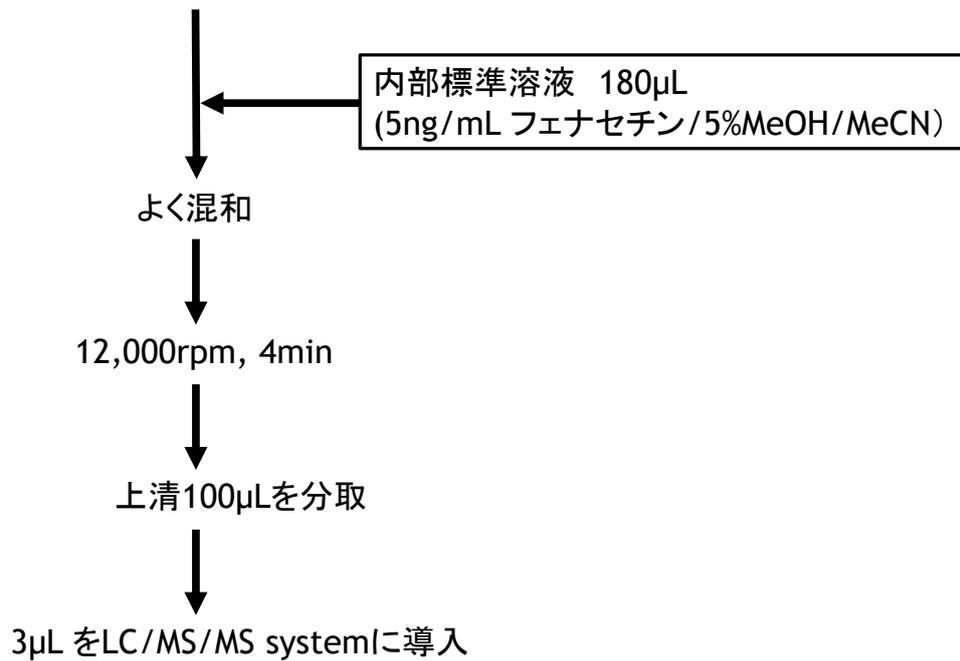


図 3-1 LC/MS/MS による検量線の作成とサンプル測定手順

20  $\mu$ L の DNP/MEM 混合マウス標準血清またはマウスサンプル血清に内部標準溶液 180  $\mu$ L を加えよく混和したのち、遠心分離にて除蛋白を行った。

上清 100  $\mu$ L のうち、3  $\mu$ L を LC/MS/MS に導入し、各化合物のピーク面積を測定した。

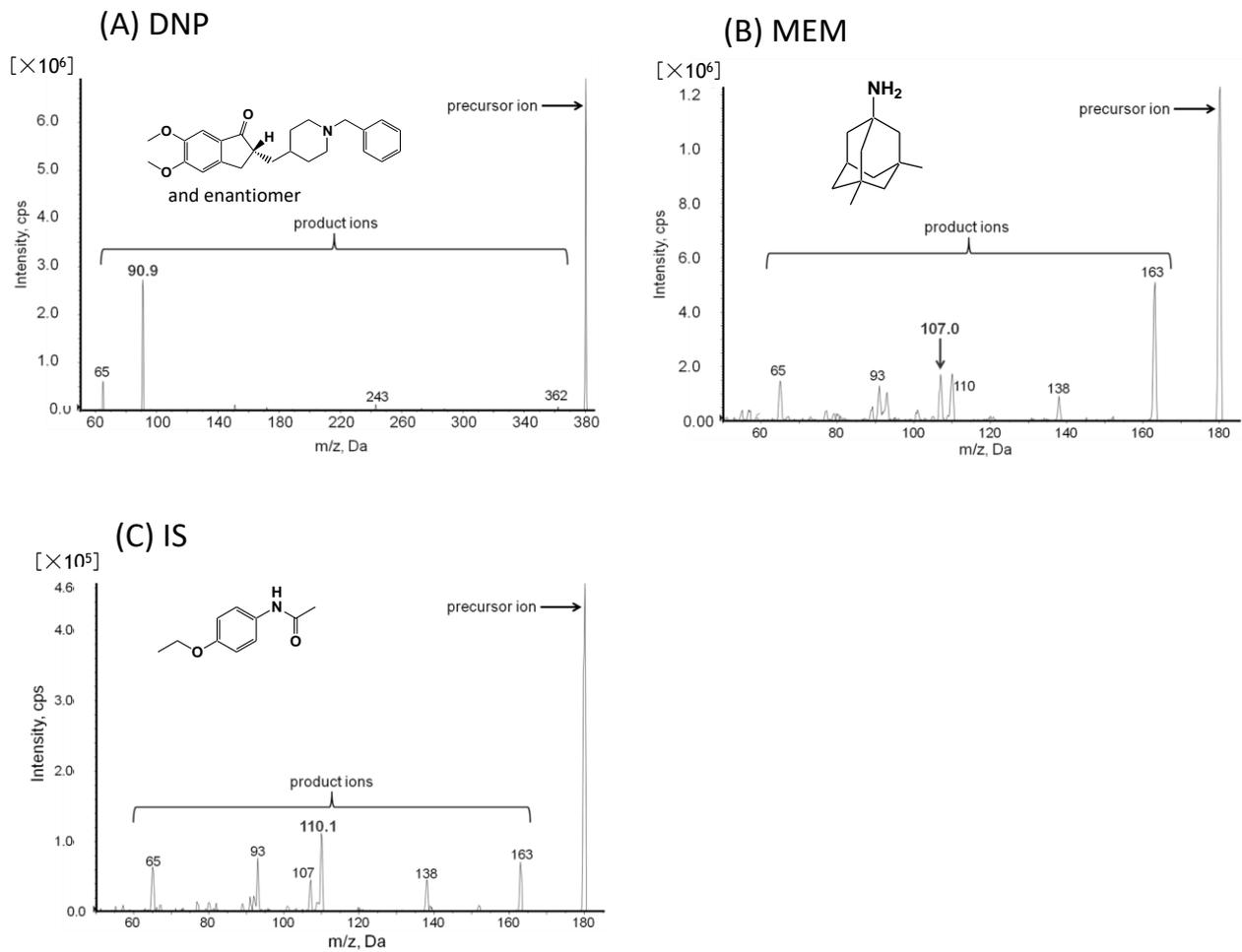


図 3-2 DNP、MEM および IS から生成されるプロダクトイオンとプリカーサーイオンのマススペクトラム

(A) DNP

(B) MEM

(C) IS

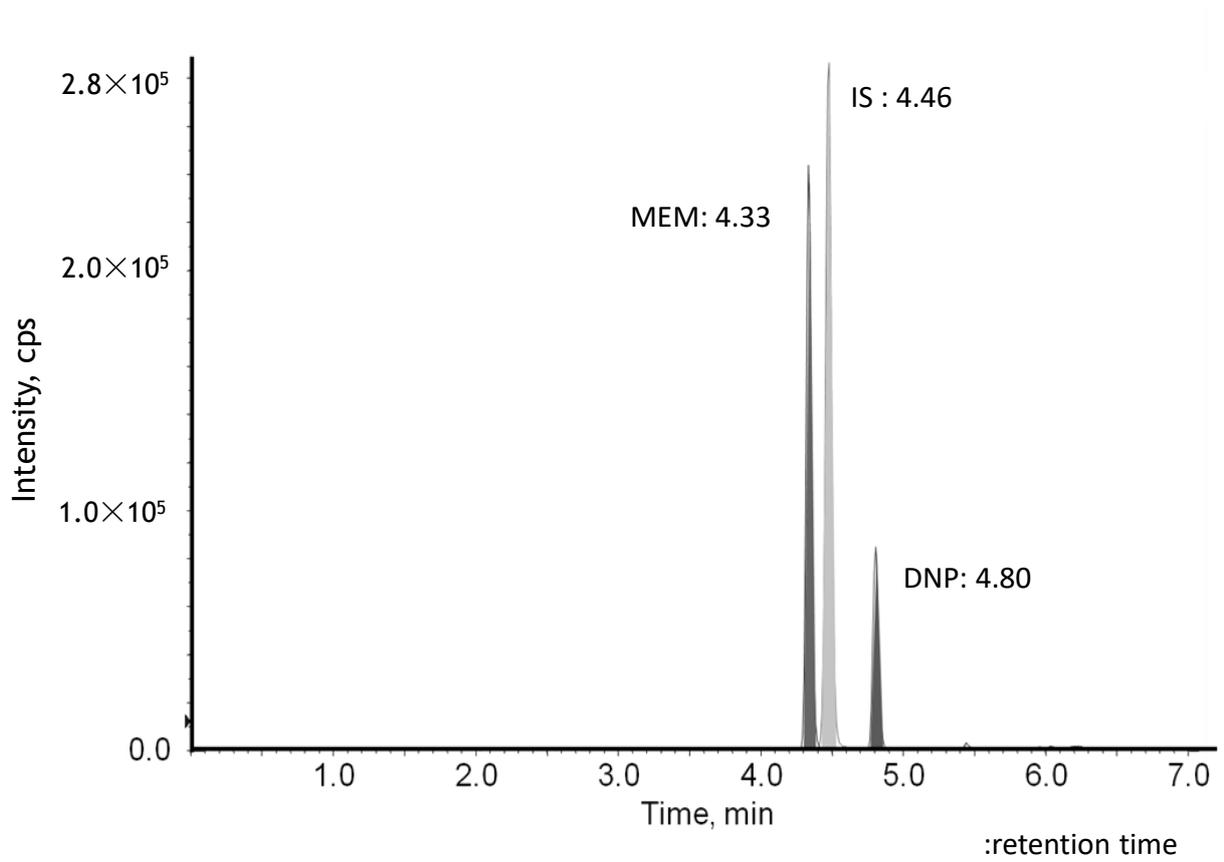


図 3-3 DNP、MEM および IS の HPLC のクロマトグラム

保持時間 MEM : 4.33min IS : 4.46min DNP : 4.80min

表 3-3 LC/MS/MS によるマウス標準血清を用いた DNP および MEM の検量線

予想濃度 (ng/mL)	DNP			MEM		
	測定濃度 (ng/mL)	Accuracy (%)	回収率 (%)	測定濃度 (ng/mL)	Accuracy (%)	回収率 (%)
3	2.89	96.5	88.4	2.92	97.3	88.0
10	11.2	112	102.8	10.8	108	98.1
30	30.4	101	93.3	30.8	103	94.8
100	101	101	98.0	103	103	95.4
300	270	90	96.4	290	96.7	99.0
<i>r</i>	0.999	-		0.998	-	

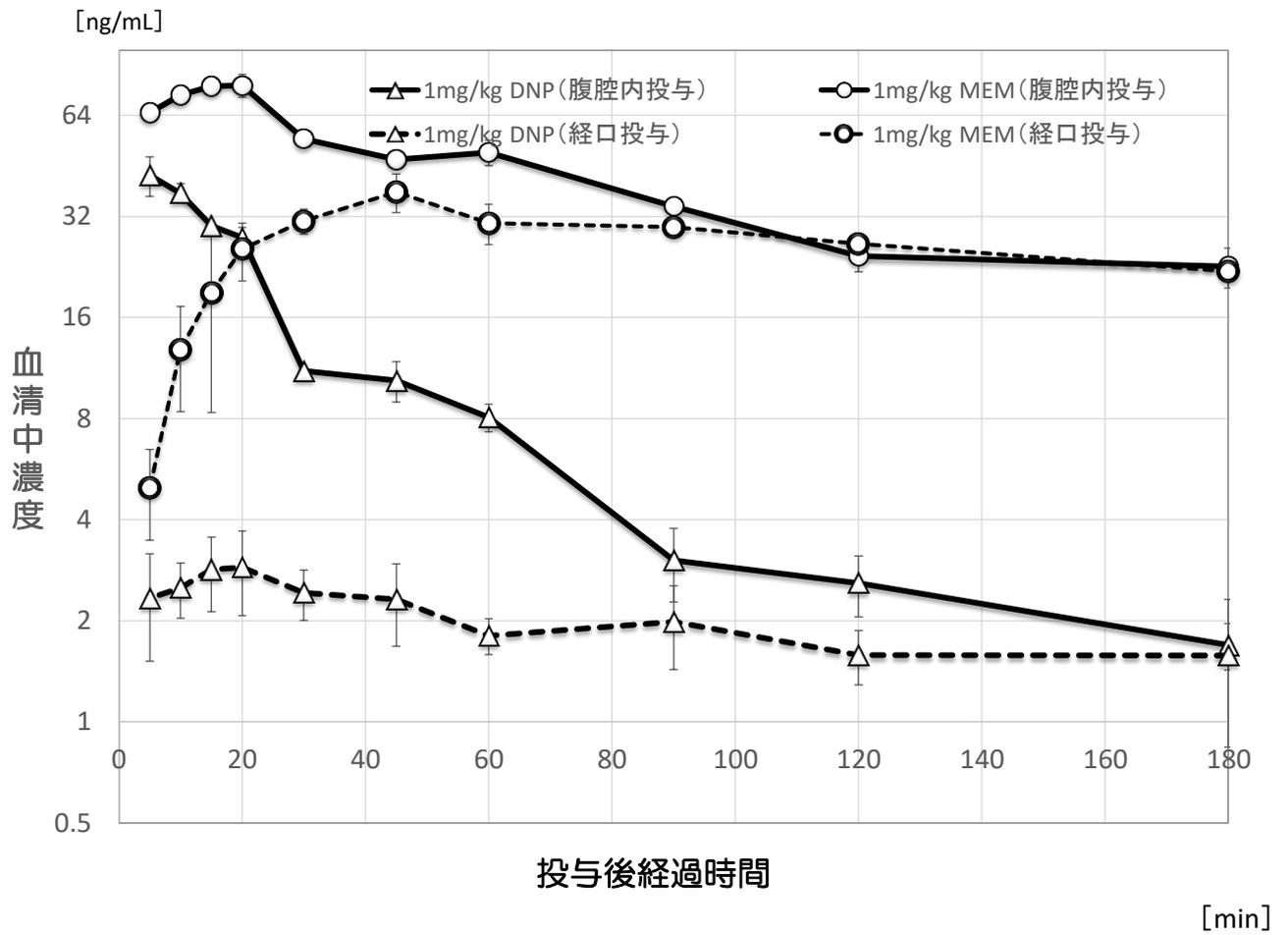


図 3-4 DNP および MEM のマウス血清中濃度の推移

DNP および MEM をそれぞれ 1 mg/kg となるように腹腔内投与または経口投与し、その後心臓より採血を実施した。

表 3-4 DNP および MEM のマウス血清中濃度に関するパラメータ

	DNP			MEM	
	腹腔内投与 (90min未満)	腹腔内投与 (90min以上)	経口投与	腹腔内投与	経口投与
$C_{max}$ [ng/mL]	42±6		3±1	79±6	38±5
$T_{max}$ [min]	5		20	20	45
$K_{el}$ [ $min^{-1}$ ]	0.0314	0.0061	0.0042	0.0075	0.0034
$t_{1/2}$ [min]	22	114	165	92	204

## 第4章 AD患者におけるDNP・MEMの血清中濃度の測定

現在、ChEI (DNP、GAL、RIV) およびNMDA受容体アンタゴニスト (MEM) の4種類がADの治療に使用されている。これらの薬剤を服用している患者の22.2%で、抗精神病薬がBPSDと関連していることが報告されている<sup>14)</sup>。DNPが投与された患者の過敏性や精神運動興奮については、MEMの内服によって改善される可能性があり、中核症状に対する効果の増強だけでなく、副作用の減少のためにも、DNPとMEMを併用する機会が増加してきている。しかし、DNPの副作用には、下痢、悪心および嘔吐、不整脈、錐体外路症状および失神が含まれ、MEMは、めまい、傾眠、転倒などの有害事象に関連している。さらにMEMは、当初はパーキンソン病の治療薬として承認されており、高用量ではドパミン放出に影響を及ぼすものと考えられる<sup>16)</sup>ことや、腎排泄型の薬剤であることから、腎機能の低下した患者では、血中濃度が上昇するため、投与量を減らす必要がある<sup>34)</sup>。

DNPまたはMEMの濃度を臨床現場で同時に測定する報告はない。一般に、AD患者を含む高齢者の身体機能には個人差が激しいことが知られており、DNPやMEMの薬物動態を投与量から単純に予測することは難しい。さらに、ADの進行に伴い、自分の体調の変化をはっきりと表現することが困難になる。これらの理由から、重篤な有害事象の発生を避けるためには、DNPおよびMEMの血清濃度を客観的指標として測定することが不可欠である。

第3章では、マウス血清中のDNPおよびMEMの薬物濃度の同時高速微量定量が、LC/MS/MSを用いて可能であることを示した。この方法を使用した測定は非常に簡単で、内部標準を含む混合有機溶媒による脱タンパクのみで、血清濃度を簡単に測定することができ、測定時間が大幅に短縮することが出来た。また、各化合物の検量線は、血清中の実際の薬物濃度の範囲内で良好な直線性を示した。このような簡単な処置にもかかわらず、マウス血清サンプルからの薬物回収は十分であり、その変動性は12%以内であった。第4章では、第3章で確立された血清中濃度測定法を用いてAD患者におけるDNPおよびMEMの血清中濃度を測定した結果について述べる。

## — 実験手順 —

### 1. 倫理的配慮

本研究は、三重県立こころの医療センター研究倫理委員会（プロトコル#20160011）の承認を得て行われ、患者の健康、安全性、プライバシー保護には十分な配慮を行った。またすべての実験手順は、ヘルシンキ宣言に従って実施した。

### 2. 試薬および材料

MEM、DNP、フェナセチンは、東京化成工業（東京、日本）から購入した。メタノールとギ酸は、和光純薬工業株式会社（大阪、日本）から購入した。LC/MS/MS分析用LC-MS CHROMASOLV®アセトニトリルは、Sigma-Aldrich（東京）から購入した。超純水は、Elix UV 5（Merck Millipore、Billerica、MA、USA）を備えた Milli-Q® Advantage A 10 システムを用いて調製した。

DNP、MEM またはフェナセチンを投与していない健常人ボランティアから採血した。収集した試料を室温、3,000 rpm で 15 分間遠心分離して、ヒトブランク血清を得た。ヒトブランク血清は分析まで 4 °C で保存した。DNP および MEM を経口投与した患者の血清サンプルについては、DNP（アリセプト D 錠; エーザイ、東京）および MEM（メマリー OD 錠、第一三共、東京）を内服しており、三重県精神医療センターに入院している患者のうち、本研究に参加することに同意した患者の血液を用いた。これらの血液サンプルを室温、3,000 rpm で 15 分間遠心分離し、患者血清を得た。

採血は患者起床後から午前 7 時まで実施した。また、薬剤の投与は DNP が朝食後（午前 7 時頃）、MEM が夕食後（午後 7 時ごろ）であった。分析前には患者血清を 4 °C で 1 週間保存した。

### 3. 内部標準溶液および混合標準溶液の調製、液体クロマトグラフィー、MS/MS

内部標準溶液および混合標準溶液の調製、液体クロマトグラフィーの分析条件、MS/MS の分析条件などについては、第 3 章と同様の条件を用いた。

### 4. LC/MS/MS 分析における定量精度の評価

LC/MS/MS 分析における定量精度を決定するために、ヒト血清からの定量値および薬物回収に対するヒト血清による効果を評価した。マトリックス A はヒト血清を含まない 5% メタノール (v/v) を含むアセトニトリルであり、マトリックス B はヒトブランク血清とした。各マトリックス (45 µL) を 450 µL の IS 溶液に添加し、十分に混和した。この液に

混合標準液（前述 5  $\mu\text{L}$ ）を添加し、ボルテックスミキサーで十分に混和し、12,000 rpm、4  $^{\circ}\text{C}$ で3分間遠心分離して、DNP / MEM 後添加標準試料を調製した。

分析用サンプルを調製して、以下のようにヒト血清からの薬物回収を評価した。各濃度の混合標準溶液 5  $\mu\text{L}$  を 45  $\mu\text{L}$  のヒトブランク血清に予め混和し、ボルテックスミキサーで十分に混和した。次いで、180  $\mu\text{L}$  の IS 溶液に血清（20  $\mu\text{L}$ ）を添加し、ボルテックスミキサーで十分に混和し、遠心分離して DNP / MEM 前添加標準試料を調製した。次いで、遠心分離後に得られた上清を LC/MS/MS システムに導入した。得られたクロマトグラムを Analyst<sup>®</sup>ソフトウェアプログラムを用いて分析した。

測定物質の検出に影響を及ぼさないマトリックス A を含む分析試料を検量線に選択し、他の試料中の薬物濃度を算出した。MRM クロマトグラムでの検体対 IS のピーク面積比を計算し、検量線を用いて薬物濃度を計算した。ヒト血清からの薬物回収は、DNP / MEM 前添加標準試料中の濃度と後添加標準試料（マトリックス B）中の濃度との比によって計算した。

## 5. LC/MS/MS を用いた MEM および DNP の血清濃度の測定

検量線サンプルは、混合標準液濃度 5  $\mu\text{L}$  を 45  $\mu\text{L}$  のヒトブランク血清に加え、十分に混合して DNP / MEM ヒト標準血清を調製した。各濃度のヒト標準血清 20  $\mu\text{L}$  を 180  $\mu\text{L}$  の IS 溶液に添加し、十分に混和し、12,000 rpm、4  $^{\circ}\text{C}$ で3分間遠心分離した。

DNP および/または MEM を服用した 14 人の患者の血清を同様に処理した。上清をサンプルバイアルに分注し、LC/MS/MS システムに 3  $\mu\text{L}$  を導入した。患者の血清中の MEM および DNP の濃度を検量線との比較により計算した。

## － 結 果 －

### 1. LC/MS/MS 分析を用いたヒト血清中 DNP・MEM の定量精度の評価

分析試料中のマトリックスの存在は、分析の選択性、感度および精度に無視できない影響を及ぼすため、DNP および MEM の測定濃度に対する分析試料中のマトリックスの影響を評価した。測定結果を表 4-1 に示した。マトリックス-A（マトリックスなし）を含有する分析サンプルを計測から得られた濃度は、すべての濃度について理論値から 10%以内の精度でよく一致した。同様に、マトリックスのない分析サンプルの計算濃度は、種々の物質を含有するマトリックス-Bの分析サンプルと 20%以内の誤差で一致した。種々の物質を含むマトリックスは、測定された薬物濃度にほとんど影響を及ぼさなかった。さらに、DNP およ

び MEM は、IS 溶液による脱タンパクの過程で血清から上清画分に適切に抽出されていた。混合有機溶媒のみを使用したヒト血清の迅速な処理により、正確な定量値で患者の血清中の MEM および DNP の濃度を決定することが可能であると考えられた。

## 2. ヒト血清中の濃度の測定

第 3 章と同様に、得られた MRM クロマトグラムを、Analyst®ソフトウェアプログラムを用いて分析した。DNP および MEM の検量線は、重み付け係数を  $1/x^2$  とすることで良好な直線性を示し ( $r=0.9997$  および  $0.9936$ )、精度は  $1\sim 300\text{ng/mL}$  の所望の濃度範囲で  $\pm 15\%$  以内であった (表 4-2)。

DNP および/または MEM を経口投与した 14 名の AD 患者の DNP および MEM の血清濃度を得られた検量線を用いて測定した。その結果を表 4-3 に示す。DNP および MEM の投与量に対する患者の血清濃度および患者背景を表 4-4 に示す。

男性と女性の比率は 7 : 7 であり、平均年齢  $\pm$  標準偏差は  $77 \pm 7$  歳であった。DNP の血清中濃度は 5 mg 投与群 ( $n=4$ ) で  $26 \pm 6$  ng/mL、10 mg 投与群 ( $n=2$ ) で  $39 \pm 17$  ng/mL であった。各投与群における最大値と最小値の比率はいずれも 1.9 倍であった。MEM の血清濃度は 5mg 投与群 ( $n=3$ ) で  $36 \pm 9$  ng/mL、10 mg 投与群 ( $n=2$ ) で  $98 \pm 66$  ng/mL、20 mg 投与群 ( $n=4$ ) で  $123 \pm 50$  ng/mL であった。各投与群における最大値と最小値の比率は 2~2.8 倍であり、DNP よりもその差は大きく、MEM の血清濃度は DNP の血清濃度よりも変動する傾向があった。特に、患者間の血清濃度の差は、MEM 10 mg および 20 mg 投与群では他よりも大きかった。

DNP および MEM について患者の体重 1 kg あたりの 1 日投与量と各薬剤の血清中濃度の相関は DNP で相関係数が 0.58、MEM で 0.79 であり、MEM について体重あたりの投与量と血清中濃度に強い相関が確認された (図 4-1)。

## — 考 察 —

この研究では、AD 患者のヒト血清中の DNP および MEM の薬物濃度の同時高速微量定量が、LC/MS/MS を用いて可能であることが示された。この測定方法は非常に簡単で、サンプルの前処理は内部標準を含む混合有機溶媒による脱タンパクのみで、血清濃度を簡単に測定することができ、測定に必要な時間を大幅に短縮することができた。また、DNP および MEM の検量線は第 3 章のマウス血清を用いた研究と同様に、患者血清中の実際の薬物濃度の範囲内で良好な直線性を示した。このような簡単な前処理にもかかわらず、血清サ

サンプルからの薬物回収は十分であり、その誤差範囲は 15 %以内であった。さらに、これまでに報告されているヒト血清またはヒト血漿中の DNP または MEM の濃度を LC/MS/MS で測定した研究では、100  $\mu$ L $\sim$ 1 mL のヒト血清または血漿が必要であった<sup>22)・30)</sup>。本研究での測定が必要であった患者血清は 20  $\mu$ L のみであり、一般的な生化学検査後に残った血清を用いて行うことができる。これは、本分析方法が単純で正確で再現性があるだけでなく、血清濃度を測定するために新たな採血を必要とせず実施することが可能であり、この方法を用いると、患者への侵襲的行為を減少させ、医療費を低下させるという利点を有することが示唆された。

DNP のヒトに対する毒性域について矢野ら<sup>35)</sup>は、DNP の副作用発現時の血漿中濃度が 54.6 ng/mL であったが、副作用改善時の血漿中濃度は 47.3 ng/mL であったことから、DNP の毒性発現には 50 ng/mL の血漿濃度が重要であると報告している。本研究でも DNP の血清中濃度が 50 ng/mL を超える患者が 1 名みられた。この患者には DNP の有害事象は発生していなかったが、消化器症状 (悪心・嘔吐など) や循環器症状 (徐脈・洞性不整脈など)、呼吸障害、縮腫などのコリン作動性の副作用のモニタリングをしながら、DNP の代謝を阻害するような薬剤の併用は避け、必要であれば投与量の減量を医師に提案すべきであると考えられた。また、AD 患者に DNP 5mg を反復投与した時の血清中濃度 17~32 ng/mL (n=4) は、研究 3 から推定された研究 2 で睡眠潜時を延長した時の血清中濃度 (0.7~1 ng/mL) の 17-46 倍であった。このことから、DNP による精神状態の悪化を回避するためには、継続した服薬によって血清中濃度を 1~50 ng/mL に保つことが有効である可能性が示唆された。

また、AD 患者に MEM 20 mg を反復投与した時の血清中濃度 64~172 ng/mL (n=4) と研究 3 におけるマウスに MEM を腹腔内投与した時の血清中濃度 50~78 ng/mL (20-60min) から考慮すると、この結果は、研究 1 及び 2 で示された MEM の鎮静効果による睡眠薬の投与量の抑制を支持すると考えられた。腎機能障害を有する患者には、MEM の慎重な投与が必要であることはメモリー®のインタビューフォーム<sup>33)</sup>にも記載されており、特にクレアチニンクリアランスが 30 mL/min 以下の患者では、維持用量を 10 mg に減量することが必要である。しかし、体重と血清中濃度の関連についてはこれまでに報告がない。本研究において、患者の体重 1 kg あたりの 1 日投与量と MEM の血清中濃度に強い相関が確認されたことから、第 3 章で考察した MEM の血清中濃度は AD 患者の体重に影響されることが明らかになり、MEM の処方設計には腎機能に加えて、患者の体重についても考慮する必要があることが示唆された。得られた結果から、体重 60 kg の患者が 20 mg の MEM を内服した場合と同じ血清中濃度を保つには、-15 kg あたり MEM を 5 mg 減量する必要があると

考えられた。また、MEM の血清中濃度を 50 ng/mL に保つには、腎機能に異常がない場合、体重 30 kg の患者には 4 mg、体重 60 kg 患者では 8 mg の MEM の経口投与でよいことが推定された。さらに、MEM の血清中濃度が予測値よりも高い患者はいずれも DNP と MEM を併用しており、DNP の MEM の血清中濃度に及ぼす影響については、今後、対象患者数を増やして検討する必要があると考えられた。

本研究の結果から、AD 患者における DNP や MEM の血清中濃度は、添付文書に記載されている投与量であっても、常に適切であるとは限らないことが示された。認知機能障害の重症度に応じて、AD 患者は自分の身体状態の変化を適切に表現するのが困難になることがある。本研究で開発された測定法は、前処理が簡便である上に、少量のサンプルしか必要とせず、患者への侵襲性は少ないことから、日常の臨床実践において極めて有用であると考えられ、この同時分析方法は、AD 患者のより効果的かつ安全な治療に貢献することができるものと考えられる。

— 第4章 図表 —

表 4-1 LC/MS/MS 分析を用いたヒト血清中 DNP・MEM の定量精度の評価

	予想濃度 [ng/mL]	測定値に対する マトリックスの影響 [ng/mL]		回収量 [ng/mL]	回収率 [%]
		matrix-A	matrix-B		
DNP	1	0.98	1.07 ± 0.02	1.22 ± 0.12	114
	3	3.13	3.58 ± 0.02	3.65 ± 0.07	102
	10	10.20	12.27 ± 0.68	11.8 ± 0.17	96
	30	31.65	33.90 ± 0.17	35.45 ± 1.91	105
	100	100.2	104.7 ± 3.5	108.3 ± 2.5	104
	300	270.5	288.0 ± 12.5	297.7 ± 3.2	102
MEM	1	0.99	1.15 ± 0.20	1.24 ± 0.16	107
	3	3.14	3.15 ± 0.12	3.58 ± 0.16	114
	10	9.88	10.73 ± 0.58	10.80 ± 0.20	101
	30	30.75	31.63 ± 0.35	32.60 ± 1.56	103
	100	98.55	101.1 ± 1.5	105.7 ± 1.5	104
	300	291.0	313.3 ± 5.5	322.3 ± 4.7	103

matrix A : 5%メタノール (v/v) を含むアセトニトリル

matrix B : ヒトブランク血清

回収量 : 測定物質の検出に影響を及ぼさないマトリックス A を含む分析試料を検量線に選択し、他の試料中の薬物濃度を算出した。MRM クロマトグラムでの検体対 IS のピーク面積比を計算し、検量線を用いて薬物濃度を計算した。

回収率 : 回収量と後添加標準試料 (マトリックス B) 中の濃度との比によって計算した。

表 4-2 LC/MS/MS によるヒト標準血清を用いた DNP および MEM の検量線

予想濃度 [ng/mL]	DNP		MEM	
	測定濃度 [ng/mL]	Accuracy [%]	測定濃度 [ng/mL]	Accuracy [%]
1	0.947	94.7	0.951	95.1
3	3.35	112	3.33	111
10	11.5	115	11.4	114
30	29.8	99.4	29.2	97.5
100	88.7	88.7	87.6	87.6
300	270.6	90.2	285.0	95.0
<i>r</i>	0.9997	-	0.9936	-

表 4-3 DNP、MEM 内服中の各 AD 患者におけるそれぞれの薬剤の  
血清中濃度

Pt ID	年齢	性別	体重 [kg]	併用 剤数*	投与量 [mg / day]		血清中 濃度 [ng / mL]		投与量/体重 [mg / kg]		
					DNP	MEM	DNP	MEM	DNP	MEM	
DNP 単剤群	1	72	M	50.6	6	5	-	17	-	0.10	
	2	87	M	57.7	9	5	-	28	-	0.09	
	3	63	M	67.8	4	5	-	29	-	0.07	
	4	66	F	65.2	6	5	-	32	-	0.08	
MEM 単剤群	5	84	F	56.9	6	-	5	-	23		0.09
	6	76	M	54.4	1	-	5	-	35		0.09
	7	77	F	39.8	5	-	5	-	46		0.13
	8	72	F	47.6	7	-	10	-	52		0.21
	9	83	F	29.8	3	-	10	-	145		0.34
	10	73	M	54.5	5	-	15	-	87		0.28
	11	84	F	29.3	8	-	20	-	155		0.68
	12	77	F	57.5	9	-	20	-	172		0.35
DNP・ MEM 併用群	13	80	M	59.4	7	10	20	27	64	0.17	0.34
	14	79	M	57.5	8	10	20	51	102	0.17	0.35

\* : DNP と MEM は除く

表 4-4 DNP、MEM 内服中の AD 患者群におけるそれぞれの薬剤の  
血清中濃度

薬剤	投与量		血清中濃度		年齢 (Year)	性別 (M/F)	併用剤数* [剤]	投与量/体重 [mg/kg]
	[mg/day]	n	[ng/mL]	Max/min				
DNP	5	4	26 ± 6	1.9	72 ± 9	2/2	6.3 ± 2.1	0.11 ± 0.03
	10	2	39 ± 17	1.9	80 ± 1	2/0	7.5 ± 0.7	0.17
	DNP total	6	-	-	75 ± 8	4/2	6.7 ± 1.8	-
MEM	5	3	36 ± 9	2	79 ± 4	2/1	4.0 ± 2.6	0.10 ± 0.02
	10	2	98 ± 66	2.8	78 ± 6	0/2	5.0 ± 2.8	0.27 ± 0.06
	15	1	87	-	73	1/0	5.0	0.28
	20	4	123 ± 50	2.7	80 ± 3	2/2	7.5 ± 0.7	0.43 ± 0.15
	MEM total	10	-	-	79 ± 4	6/4	5.5 ± 2.6	-
Total		14	-	-	77 ± 7	7/7	6.0 ± 2.3	-

\* : DNP と MEM は除く

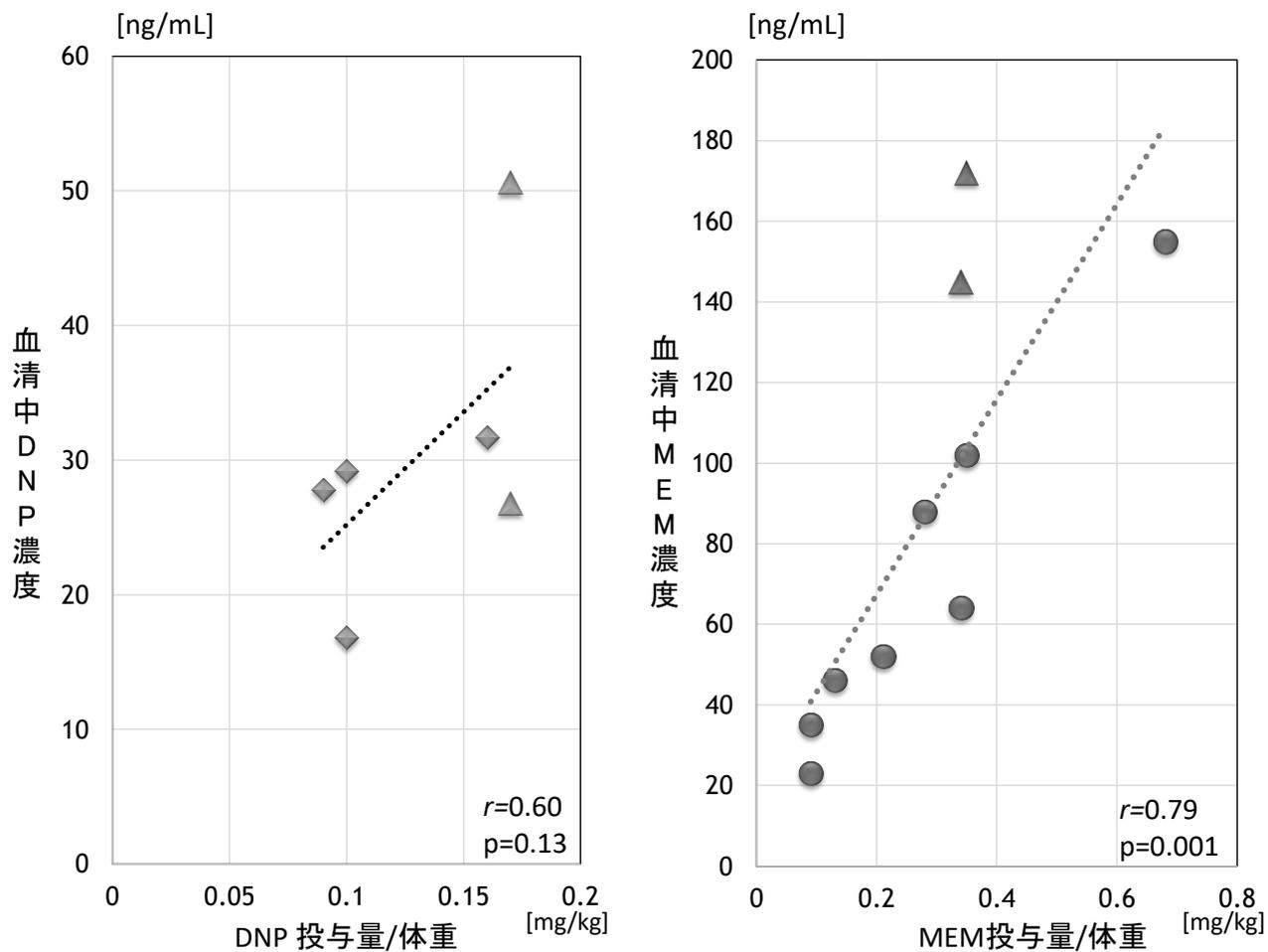


図 4-1 DNP および MEM の投与量/体重と血清中濃度

◆ : DNP 単剤群 ● : MEM 単剤群 ▲ : DNP・MEM 併用群

## 結 語

認知症治療の基本構造は、薬物療法、非薬物療法、介護者の対応の工夫、リハビリテーションの4つのコンポーネントから成り立っており、この4つのどれが欠けていても治療はうまくいかないとされている<sup>36)</sup>。病院薬剤師は、その中でも特に薬物療法に深く関与しているわけだが、具体的な内容としては、①患者本人に対する薬効・副作用のモニタリングと薬剤管理、②臨床スタッフとの協働による処方設計、③持参薬の管理、④家族や退院後入所する施設の職員への服薬指導などが挙げられ、これらの多くは多職種チームによる活動の一翼を担うものである。当センターに入院となる認知症者においては、その症状や問題行動が著しい場合が多く、薬剤師が多職種チームの一員として介入する場合には、出来るだけ早く問題となった症状を抑えつつ、有害事象が出来るだけ少なく、外来での治療継続に繋がることを目指した処方設計や剤形選択を踏まえた処方提案が必要であると考えている。

特に精神科病院を受診する認知症者では、BPSDによって周囲の介護者が疲弊しきってしまってから受診することが多くみられ、BPSDは介護者にとっては非常に大きな負担となる症状である。しかし、BPSDの改善に用いられる抗精神病薬については適用外使用であり、諸外国ではBPSDに対する抗精神病薬の治療に警告を発していることなどを考慮すると、循環器障害や感染症に対するモニタリングは必須項目である。また、転倒転落のリスクがある睡眠薬もできるだけ必要時に必要量のみを用いることが望ましい。

その上で認知症治療薬を有効に用いることはADの中核症状改善に加え、有効な精神科薬物療法を提供するうえでも重要である。認知症者に対する薬物療法支援において、多職種チーム内だけでなく患者や家族などからも薬剤師に期待されている役割は非常に大きい。チームの一員としての役割を果たすだけでなく、チームの要としての役割やチーム間を繋ぐ架け橋としての役割をもっと認識・実践することで薬物療法や治療全体のさらなる質の向上につながっていくものと考えられる。

本研究では、AD患者に対して精神科薬物療法を実施する場合、低用量のDNPで精神症状の悪化の可能性があること、MEMの投与量を決定する際には患者の体重にも着目する必要があることが示唆された。また、今回開発した血清中濃度測定法を用いることで有効性はあるが有害事象は回避できる投与量の決定が可能となり、処方設計の一助となるものと考えられた。本研究の成果は我々薬剤師がAD患者の薬物療法を考える上で重要な要素をなしていると考えられる。

## 利益相反

本研究の実施にあたり、開示すべき利益相反はない。

## 引用文献

- 1) American Psychiatric Association 編：DSM-5 精神疾患の分類と診断の手引. 2016, pp266－300, 医学書院, 東京
- 2) 内閣府：高齢社会白書 平成 29 年版. 2017, pp 19－22, 日経印刷, 東京
- 3) 朝田 隆：都市部における認知症有病率と認知症の生活機能障害への対応 平成 23 年度～平成 24 年度総合研究報告書（厚生労働科学研究費補助金 認知症対策総合研究事業）. 2013, pp12－14
- 4) 厚生労働省：かかりつけ医のための BPSD に対応する向精神薬使用ガイドライン（第 2 版）.2017 年 5 月 28 日参照, <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-12300000-Roukenkyoku/0000140619.pdf>,
- 5) 日本神経学会編：認知症疾患診療ガイドライン 2017. 2017, pp 54－91, 医学書院, 東京
- 6) Gauthier, S.; Feldman, H.; Hecker, J.; Vellas, B. et al. : Efficacy of donepezil on behavioral symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease. International Psychogeriatrics. 2002, vol.14, 389－404
- 7) Wilcock, GK.; Ballard, CG.; Cooper, JA.; Loft H.et al. : Memantine for agitation/aggression and psychosis in moderately severe to severe Alzheimer's disease: a pooled analysis of 3 studies. The Journal of Clinical Psychiatry. 2008, vol.69, 341－348
- 8) Tariot, PN.; Farlow, MR.; Grossberg GT.; Graham SM. et al : Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving Donepezil: a randomized controlled trial. JAMA. 2004, vol.291, 317－324
- 9) 稲垣 中, 稲田 俊也：向精神薬の等価換算(第 26 回) 新規抗精神病薬の等価換算(その 7) Asenapine. 臨床精神薬理. 2017, vol.20, 89－97
- 10) 稲垣 中, 稲田 俊也：向精神薬の等価換算(第 24 回) 抗不安薬・睡眠薬の等価換算(その 3) Eszopiclone. 臨床精神薬理. 2012, vol.15, 1403－1406

- 11) 日本腎臓学会編：CKD 診療ガイド 2012.. 2012, pp 1-4, 東京医学社, 東京
- 12) 日本高血圧学会編：高血圧治療ガイドライン 2014. 2014, pp 88-96, ライフサイエンス出版, 東京
- 13) Zhang, L.; Zhou, FM.; Dani, JA. : Cholinergic Drugs for Alzheimer's Disease Enhance in Vitro Dopamine Release. *Molecular Pharmacology*. 2004, vol.66, 538-544
- 14) 宮村季浩, 安田朝子, 木之下徹, 元永拓郎ら：行動・心理症状（BPSD）に対する不適切な薬剤使用について. *老年精神医学雑誌*. 2012, vol. 23,63-73
- 15) 有賀 文彦、宇土 研二, 藤村 高志, 木村 均ら：新規アセチルコリンエステラーゼ阻害剤塩酸ドネペジルの基礎的研究 塩酸ドネペジル(Donepezil)のマウスにおける急性毒性試験 . *薬理と治療*. 1998, vol.26, S1163-S1168
- 16) Spanagel, R.; Eilbacher, B.; Wilke, R. : Memantine-induced dopamine release in the prefrontal cortex and striatum of the rat--a pharmacokinetic microdialysis study. *European Journal of Pharmacology*. 1994, vol. 262(1-2), 21-26
- 17) Gauthier, S.; Loft, H.; Cummings, J. : Improvement in behavioural symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease by memantine: a pooled data analysis. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 2008, vol. 23, 537-545
- 18) 厚生労働省：厚生統計要覧 平成 28 年度.2017, 厚生労働統計協会, 東京
- 19) Tariot, PN.; Farlow, MR.; Grossberg, GT.; Graham SM.et al. : Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil : A randomized controlled trial. *JAMA*. 2004, vol. 291, 317-324
- 20) Suresh, P.; Ramesh, M.; Sathesh, K. : Highly sensitive LC/MS/MS method for determination of memantine in rat plasma: Application to pharmacokinetic studies in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2014, vol. 48, 54-65
- 21) Bhateria, M.; Ramakrishna, R.; Pakala, D.; Bhatta, R. : Development of an LC/MS/MS method for simultaneous determination of memantine and donepezil in

- rat plasma and its application to pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 2015, vol. 1001, 131–139
- 22) Apostolou, C.; Dotsikas, Y.; Kousoulos, C.; Loukas, YL. : Quantitative determination of donepezil in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry employing an automated liquid–liquid extraction based on 96-well format plates application to a bioequivalence study. *Journal of Chromatography B.* 2007, vol. 848, 239–244
- 23) Iordachescu, A.; Silvestro, L.; Tudoroni, A.; Savu, SR.et al. : LC/MS/MS method for the simultaneous determination of donepezil enantiomers in plasma. *Chromatographia.* 2012, vol. 75, 857–866
- 24) Konda, RK.; Challa, BR.; Chandu, BR.; Chandrasekhar, KB. : Bioanalytical method development and validation of memantine in human plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Application to bioequivalence study. *Journal of Analytical Methods in Chemistry.* 2012, 101249
- 25) Lu, Y.; Wen, H.; Li, W.; Chi, Y.; Zhang, Z. : Determination of donepezil hydrochloride (E2020) in plasma by liquid chromatography mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies in healthy, young, Chinese subjects. *Journal of Chromatographic Science.* 2004, vol. 42, 234–237
- 26) Noetzli, M.; Choong, E.; Ansermot, N.; Eap, CB. : Simultaneous determination of anticholinesterase drugs in human plasma for therapeutic drug monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring.* 2011, vol. 33, 227–238
- 27) Noetzli, M.; Ansermot, N.; Dobrin, M.; Eap, CB. : Simultaneous determination of anticholinesterase drugs in human plasma: procedure transfer from HPLC-MS to UPLC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2012, vol. 64–65, 16–25
- 28) Pan, RN.; Chian, TY.; Kuo, BPC.; Pao, LH. : Determination of memantine in human plasma by LC/MS/MS. Application to a pharmacokinetic study. *Chromatographia.* 2009, vol. 70, 783–788

- 29) Patel, BN.; Sharma, N.; Sanyal, M.; Shrivastav, PS. : Quantitation of donepezil and its active metabolite 6-O-desmethyl donepezil in human plasma by a selective and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometric method. *Analytica Chimica Acta*. 2008, vol. 629, 145–157
- 30) Pilli, NR.; Inamadugu, JK.; Kondareddy, N.; Karra, VK.et al. : A rapid and sensitive LC/MS/MS method for quantification of donepezil and its active metabolite, 6-*O*-desmethyl donepezil in human plasma and its pharmacokinetic application. *Biomedical Chromatography*. 2011, vol. 25, 943–951
- 31) インタビューフォーム：アリセプト®. 2017年12月参照, エーザイ, 東京
- 32) 松井 賢司, 影井 佳子, 水尾 均, 三島 万年ら：新規アセチルコリンエステラーゼ阻害剤塩酸ドネペジルの基礎的研究 ラットにおける<sup>14</sup>C標識塩酸ドネペジル(Donepezil)単回経口投与時の吸収,分布,代謝及び排泄. *薬理と治療*. 1998, vol. 26, S1339–1355
- 33) インタビューフォーム：メマリー®. 2017年12月参照, 第一三共, 東京
- 34) Moritoyo T., Hasunuma T. , Harada K. , Tateishi T. et al. : Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of memantine. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2012, vol. 119, 324–329
- 35) 矢野 英隆, 福原 葉子, 和田 健二ら：過剰内服によるコリン作動性副作用を認めた塩酸ドネペジル急性中毒の1例 経時的な薬物血中濃度による検討. *臨床神経学*. 2003, vol. 43, 482–486
- 36) 新井平伊：新規抗精神病薬に求められるもの：認知症治療の新たな展開. *臨床精神薬理*. 2011, vol. 14, 1123–1129

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご協力・ご助言をいただきました鈴鹿医療科学大学薬学部教授 三輪高市先生に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、多大なるご助言をいただきました三重県立こころの医療センター院長 森川将行先生に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、ご協力・ご助言をいただきました鈴鹿医療科学大学薬学部教授 川西正祐先生、教授 田口博明先生、准教授 林 雅彦先生、助教 坂 晋先生、助手 藤澤 豊先生および諸先生方に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、ご協力・ご助言をいただきました三重県立こころの医療センター診療技術部長 中瀬玲子先生、同技師長兼薬剤室長 矢下里美先生、同臨床検査室長 尾邊知子先生、同薬剤室・臨床検査室のみなさまに深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、動物実験にご協力をいただきました鈴鹿医療科学大学薬学部三輪研究室の卒業生ならびに在学生のみなさまに深く感謝いたします。

## Abstract

### Investigation into proper use of anti-dementia drugs ~ Examinations of the usefulness of donepezil and memantine for psychiatric pharmacotherapy ~

#### Introduction

Currently, three types of cholinesterase inhibitor (ChEI), donepezil hydrochloride (DNP), galantamine hydrobromide, rivastigmine and one kind of *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, memantine hydrochloride (MEM) is prescribed for core symptoms of Alzheimer-type dementia (AD). There is no fundamental difference in the anti-dementia drugs on the progression-inhibiting effect of AD, but it is properly used depending on the type of dementia, severity, formulation, liver function and kidney function, behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD) and so on. Also, when providing psychiatric medication to BPSD in AD patients, we need to pay attention to the following points, change in the biological function accompanying aging, an interaction between a therapeutic agent for complications and a psychotropic drug, and to become unsuitable for their own conditions as the progresses of dementia. However, it should be avoided that mental symptoms are not improved to become a less passive medicine therapy to concentrate on avoiding adverse events.

In this studies, to clarify the clinical problems of DNP and MEM and suggest countermeasures, in order to assemble drug therapy in which mental symptoms are improved and adverse effects on adverse events against ADL are minimized, we aimed to provide more effective and safer medication therapy for AD patients from the perspective of the pharmacist.

#### Chapter 1. Prescription survey on anti-dementia drugs and psychotropic drugs in AD patients

Psychotropic drugs are often prescribed to improve BPSD for AD patients who are admitted to psychiatric hospitals. However, adverse events of antipsychotic drugs or benzodiazepine drugs (BZD) may develop into such a serious accident affecting prognosis and ADL, aspiration pneumonia, falls, fractures and so on. In this study, we investigated

the prescription status of ChEI and MEM of AD patients, the combined use and dosage of antipsychotics and hypnotics. We classified and analyzed 84 patients in this group into four groups of ChEI monotherapy group, MEM monotherapy group, ChEI and MEM combined therapy group, and no prescription group.

As a result, in the ChEI monotherapy group, the prescription rate of hypnotics was significantly higher than that of the other groups, and the diazepam (DAP) equivalent value of hypnotics was significantly higher than that of the no prescription group and the MEM monotherapy group. From this fact, we estimated that prescription rates and DAP equivalent values of hypnotics increased due to excitement by ChEI to such an extent that the central nervous system does not induce psychotic symptoms. Also, in the MEM monotherapy group, the prescription ratio of BZD-based hypnotics was significantly lower than that of the other groups, and the DAP equivalence value was not significantly different from no prescription group. It was thought that the sedative effect of MEM led to the suppression of the increase in the dose of hypnotics.

From these facts, attention to the excitement of ChEI, effective use of MEM suppressed the administration of BZD hypnotics, suggesting the possibility of avoidance from adverse events such as falls and fractures.

## **Chapter 2. Effects of DNP and MEM on sleep of mice by pentobarbital-induced**

The influence on sleep of DNP and MEM was examined with mice on the consideration of ChEI and MEM sleeping medicine obtained from chapter 1. After intraperitoneal administration of DNP or MEM to ddY male mice, a 45 mg/kg pentobarbital solution was intraperitoneally administered. After that, the time until the forward reflex disappeared (sleep latency) and the time from the disappearance of forward reflex to recovery (sleep time) were measured.

As a result, the sleep latency was significantly extended in the 0.03 mg DNP administration group. Regarding sleeping time, although there was an extension trend in the MEM administration group, no significant difference could be confirmed. This result seemed to support the possibility of mild excitation of the central nervous system by ChEI of DNP shown in chapter 1.

## **Chapter 3. Simultaneous measurement of serum concentrations of DNP and**

## **MEM using liquid chromatography– tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)**

There are such points of caution when using DNP and MEM for AD patients is that DNP is subject to drug metabolism by hepatic metabolizing enzymes and MEM has the possibility of prolonging half life due to reduction in glomerular filtration rate and kidney blood flow rate. In order for a pharmacist to propose a highly effective dose of DNP or MEM to a doctor, serum concentration is one of the most important indicators, and development of a simple analytical method for measuring them is hoped. However, analytical methods have been reported so far to independently measure the concentration of DNP or MEM, but there is no report that DNP and MEM were simultaneously measured for serum of patients with AD. Furthermore, in conventional analysis methods, the method of extracting drugs from blood is complicated, but for clinical applications such manipulations are simple and it is necessary to rapid, and high reproducibility within the range of assumed serum concentrations. Also, in order to reduce the number of blood collections, it is desirable to be able to analyze with a small amount of serum.

In this study, we developed a simple, quick and accurate method to simultaneously measure serum concentrations of DNP and MEM administered to mice by LC/MS/MS using phenacetin as an internal standard. This method is only deproteinization by mixed organic solvent including internal standard, serum concentrations could be easily measured. In addition, the calibration curve of each compound showed good linearity within the clinical serum drug concentration range. From these results, it was considered that the serum concentration measurement method developed in this study could be applied to human serum.

### **Chapter 4. Measurement of serum concentration of**

#### **DNP and MEM in AD patients**

We measured the serum concentrations of DNP and MEM in AD patients using the method of chapter 3. The average serum DNP concentration in the group administered with 5 mg DNP / day was  $26 \pm 6$  ng/mL (n=4) and the average serum MEM concentration in the group administered with 20 mg MEM / day was  $123 \pm 50$  ng/mL (n=4). There was one patient with  $> 50$  ng/mL that could have adverse events of DNP. Although no adverse

events occurred in this patient, it was thought that DNP should be used with attention to drug interaction. In addition, it was revealed that the serum concentration of MEM was also affected by the body weight of AD patients, suggesting that it is necessary to consider the weight of the patient in addition to the renal function in the prescription design of MEM.

Considering that these patients were taking 1 to 9 drugs in addition to DNP and MEM, this method is the most useful way to simultaneously and specifically quantify only DNP and MEM. This method could contribute to the provision of more effective and safer psychiatric medication for AD patients.

## **Conclusion**

Based on these findings, it was suggested that psychiatric drug therapy for AD patients may deteriorate psychiatric symptoms and sleep disorders at low concentrations of DNP. In addition, it was shown that attention should be paid to the weight of the patient when determining the dose of MEM. Furthermore, using the serum concentration measurement method developed in this study, it was thought that it helps the most effective formulation design, since it is possible to determine the dose that can avoid adverse events.