

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07903

研究課題名(和文) 呼気を用いる非侵襲的薬物動態解析法に関する研究

研究課題名(英文) Study on non-invasive assessment of pharmacokinetics by exhaled breath

研究代表者

山本 敦 (YAMAMOTO, Atsushi)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60360806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：テオフィリンを投与したラット呼気からの薬物回収法を確立した。ラットの場合、時間当たりの呼気排泄量が不明のため、呼気量の指標物質の検索が課題として残った。
花粉症治療薬フェキソフェナジンを服用したヒトでの呼気実験では、血中と呼気中の薬物濃度に相関が認められなかった。薬剤の拡散や能動的な移送が大きな相違を生じさせていた。ヒト呼気はインピンジャーを使った呼気凝縮液を使用した。この方法でのエアロゾル捕集効率も低く、ろ過膜捕集法への転換が課題として残った。

研究成果の概要(英文)：The method was established to collect the drug in exhaled breath of rat administered theophylline. The rat expiratory volume per time was uncertain, however, the search of endogenous biomarkers for the expiratory volume was left as a pending problem.
The analysis of fexofenadine, an antihistamine pharmaceutical drug, in human breath and blood could not meet good correlation. There was no tendency for the determined amount of fexofenadine in breath to decrease with the elapsed time. The existence of the blood-lung interface was suggested.
Although the exhaled breath condensate was used for breath analysis, there was a tendency for low collection rate of the breath aerosol. The filter sampling method for the aerosol would be desired.

研究分野：分析化学

キーワード：Non-invasive TDM Exhaled breath Aerosol collection

1. 研究開始当初の背景

薬物治療では、その薬効量と副作用量の個人差を把握することが重要である。経験による薬物投与量(さじ加減)の危うさから治療薬物モニタリング(TDM)の必要性が唱えられてきた。例えば、小児急性リンパ性白血病ではTDMを使ったテーラーメイド投薬により生存率が大幅に改善され(W.E. Evans, *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1998, 338, 499)、TDMの有用性が示されている。現在、我国での保険診療報酬対象薬物の数は48種類にまで拡大されている。このTDMの今後の課題は、ベッドサイドや、更には一般の家庭でも実施できる非侵襲化と、本当の意味でのリアルタイムモニタリングの実現である。

TDMの上記課題解決のため、血液以外の体液による薬物濃度測定が検討されている(K.S.R. Raju, *et al.*, *Biomed. Chromatogr.* 2013, 27, 1354)。最も注目されているのが唾液である(P.N. Patsalos, D.J. Berry, *Ther. Drug Monit.*, 2013, 4, 35)。唾液線には血清成分も分泌されており、しかも非侵襲的な採取が可能である。ただ流量変化があり、採取法によって成分濃度が変動するなどの課題がある(R.P. Agrawal, *et al.*, *J. Diabetes Metab.*, 2013, 4, 1000266)。一方、呼気中からは様々な難揮発性化合物が検出されているにも関わらず(A.C. Almstrand, *et al.*, *Anal. Chem.*, 2009, 81, 662)、TDMの代替試料として検討された例はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、呼気から排泄される薬物量を使って薬物動態を解明することである。ヒトでのTDM適用が最終目標であるが、その前に動物実験によって、呼気中と血中での薬物濃度の相関性を明らかにすること、そのための呼気吸着剤を開発すること、最終的に本法をヒトに適用するために、呼気から捕集した薬物や代謝物を吸着剤上で直接測定するベッドサイド法、すなわち固相発光法を確立したい。具体的には、血液-肺インターフェイスの存在有無を明らかにする。従来の懸濁重合法は、大量の樹脂合成に適しているが、得られる粒子の粒度分布が広いと、歩留まりが悪い。また、合成には熟練した技術が必要とする。本研究では誰もが容易に粒度の整った樹脂合成が可能な膜乳化法を確立する。オンサイト固相発光法を適用するためには、目的薬剤に特異的な吸着特性を持った吸着剤が不可欠である。その開発に着手する。

3. 研究の方法

一回換気量の少ない動物実験用の吸着剤開発から行う。我々の予備研究では、細孔径が小さく比表面積の大きな通常の固相抽出用吸着剤をベースに行ったため、ラットの呼吸通過に抵抗があり、また満足できる薬物捕集効率が得られなかった。ラット呼気用吸着剤の要件は、通気抵抗を小さくするために1μm

ほどの貫通孔を持った樹脂で、吸着効率を改善するために粒径は100μm以下が適していると推定される。樹脂を構成する疎水性モノマと親水性モノマの組成比は、従来通り85:15とする(BG15)。における動物適用薬物は、従来通りのテオフィリンを使用するが、呼気サンプリング法は自発呼吸法とアクティブサンプリング法を比較する。また、ラットの麻酔下と覚醒下での排泄量の比較を行う。

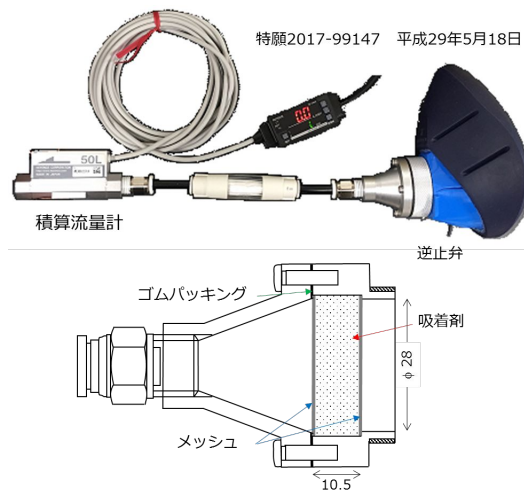


図1. ヒト呼気回収マスク

ヒトは花粉症治療薬のフェキソフェナジン(FE)に対応する。ラットと同じ吸着剤を専用のマスク型の呼気捕集装置(図1)に充填して行う。この装置は東海光学(株)と共同で開発したもので特許申請中である。吸着剤粒径は使用量と圧力損失を考慮して0.5-1.0mm程度のもので使用した。吸着剤はメタノールで溶出後、溶媒転溶、濃縮してLC-MSで測定した。呼気と同時に血液も採取・測定を行う。採血は指先穿刺で行い、測定までの一連の操作は、パーティションで区別された一角で被験者により全て完結させる。血漿中のFEはLC-FLで測定した。

の直接膜乳化法による吸着剤合成では、均一な貫通細孔を持つといわれるSPGフィルターを用いた。分散相(モノマーを含む油層)の送液速度と分散媒(重合反応が行われるo/w型水層)の攪拌速度を検討した。

において我々の考えるベッドサイドTDMモニタリング法とは、吸着剤表面に捕集した分子標的治療薬を、直接固相蛍光で検出しようというものである。幸い、殆どの薬剤は発光性を持っている。今回は、呼気から直接捕集した薬剤を、洗浄でマトリクス成分を除去し、励起・蛍光波長が可変型のオンサイト固相蛍光装置で定量する。これにより分子標

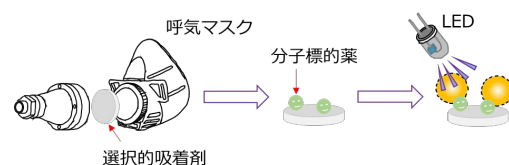


図2. 呼気からの薬物モニタリング概略

的治療薬の肺組織内濃度が有効濃度に達していることを確認し、飲み忘れなどによる薬効喪失を防ぐことができる。目的薬物としては、肺がん治療薬としての分子標的治療薬が最適と考える。呼気は、まさに患部での薬物濃度を反映するからである。肺がんのファーストライン薬であり、間質性肺炎という副作用を有するゲフィチニブ(Gef)の呼気分析を選択した。

4. 研究成果

(1) 呼気エアロゾルの正体

不揮発性薬物が呼気エアロゾルに溶解されて排泄されることが認識されたのは、呼気から薬物代謝物が検出されてからであり(O. Beck, *et al.*, *J. Anal. Toxicol.*, 2011, 35, 541)、まだ十年も経っていない。呼気中でのエアロゾル生成機構は、細気管支内でのメニスカス膜破裂 (BFFB) モデル(G.R. Johnson, L. Morawska, *J. Aero. Med. Pulm. Drug Deliv.*, 2009, 22, 229)が最も妥当であると考えられているが、そのエアロゾルの本質には誰も触れていない。我々は、図3に示すような超音波ネブライザを使った模擬呼気発生装置でエアロゾルの物性を調べた。実験背景としては、

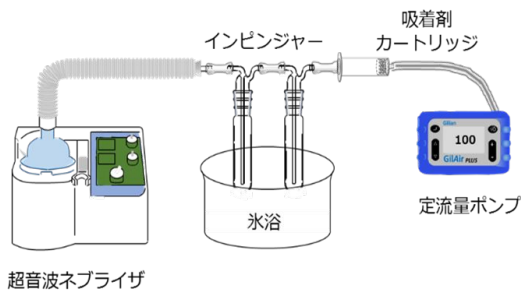


図3. ネブライザを使った模擬呼気実験

ラット呼気回収実験において親水性吸着剤からは薬物が回収されず、疎水性の吸着剤に移行した経緯がある。哺乳類の肺の細気管支被覆液には、肺胞の虚脱を防ぐためにサーファクタントとしてリン脂質が存在する。今回は、0.1 mg/mL テオフィリンのPBS溶液に各種濃度のレシチンを添加した溶液を小さなミストとして吸着剤での捕集効率を調べた。その結果、ごく微量レシチンを添加しただけで疎水性吸着剤でのテオフィリン捕集率が改善したことより、呼気から排泄されるエアロゾルは単なる水滴ではなく、表面疎水性の逆ミセルであろうと結論した。

(2) ラット呼気アクティブサンプリング法

ラット気道に 80 μm 程度の吸着剤を 50 mg 充填したカートリッジを挿入すると、自発呼吸はかなり困難となる。そこで吸引ポンプアシストによる呼気捕集を試みた。吸着剤量は従来の4倍の200 mgを使用した。実験模式図を図4に、また結果を図5に示す。テオフィリン血中濃度は、静注のため投与直後に極大値を迎え、その後減少していくのに対し、呼気からの排泄濃度は1-2時間後に極大となっ

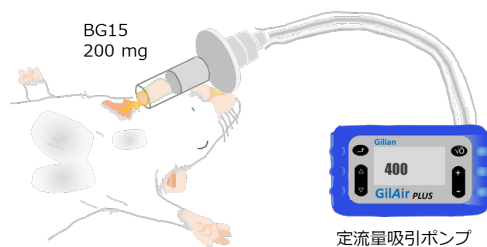


図4. ラット呼気アクティブサンプリング法

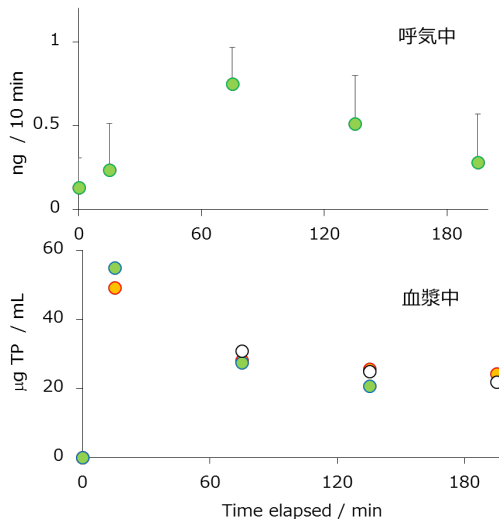


図5. ラット実験結果

た。この時点でラット実験に使用していた麻酔薬ペンタバルビタールに制限が掛かり、ドミトール、ミダゾラム、ベトルファールの三種混合麻酔薬への変更を余儀なくされた。これ以降、ラット呼気からのテオフィリン回収量が極端に少なくなった。突然の麻酔切れを防ぐために、多量の麻酔薬投与が必要となり、呼吸が浅くなったためと推定した。

そこで、ラット覚醒下での呼気採取を行うことにした。図6のように、ペットボトルで装置を構築し、テオフィリン投与後の覚醒ラットからの呼気を全て吸着剤に誘導するため、1 L/min で吸引した。吸着剤量は倍の400 mgとした。この方法で得られたラット呼気中からは、前回と同等のテオフィリンが捕集された。図6は2匹の結果であるが、バラつきが大きい。特に高い値の時間帯は、ラットが活発に動き回っていた。呼気からの薬物排泄は、

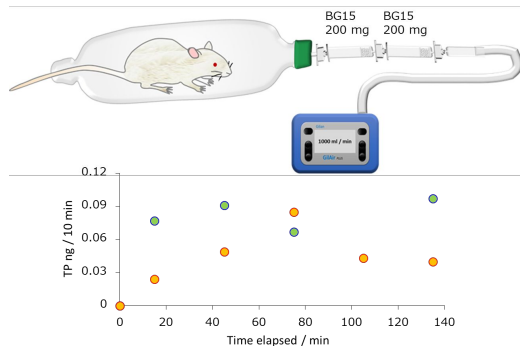


図6. ラット覚醒下での呼気回収

呼吸深度に大きく関連し、覚醒時での呼気採取はその活動にも影響されることが判明した。

(3) ヒト呼気実験

ヒト呼気からの FF 定量はポジティブモードでの LC-MS で行った。1 g もの吸着剤を使用すると、そこからの妨害成分の溶出も無視できなくなり、 $m/z=502$ での妨害ピークの出現で微量定量が困難となった。今回、ヒト呼気においては呼気凝縮液(I. Horváth, *et al.*, *Eur. Respir. J.*, 2017, 49, 1600965)を用いることにした。図 7 に結果を示すが、血中 FF 濃度は服用後 2 時間で極大を迎えた。FF のインタビューフォームによると、血中濃度は 2-3 時間で最高濃度に到達し、10 時間後にはほぼ消失するとされている。今回の結果はそれとよく一致した。一方、呼気中 FF 排泄量は、投与後 8 時間でも増加傾向が認められた。測定のパラつきが大きいと考察は難しいが、同じインタビューフォームによると、マウス肺中での FF 濃度は最高濃度到達時間が遅くなり、投与 24 時間後でも検出されていた。今回の呼気中濃度がこれと相関があるのであれば、呼気中の薬物濃度は肺という臓器中に分布された薬物濃度を反映することになる。本研

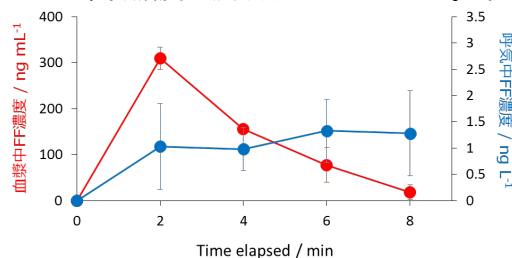


図7. ヒト呼気実験結果

究の当初の目的は、呼吸を使った薬物血中濃度の推定であったが、呼吸は肺に特化した TDM 体液になりうる、もっと積極的に治療指標になりうる体液であると断言できる。そのためには、もっと明確なエビデンスが必要で、呼気凝縮液は呼気エアロゾルの捕集効率が極めて低いという報告もあり(D. Verreault, *et al.*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2008, 72, 413)、新たな吸着素子の探索が必要となる。

(4) 呼吸用吸着剤の合成法の確立

ラットのアクティブサンプリング法では、通気性を無視して 200 mg 程度の BG15 をカートリッジに充填することで、満足のいくエアロゾル吸着が達成された。ヒトの呼気採集は自発呼吸で行うため、フィルターの口径と充填量が重要な吸着因子となるが、g 単位の吸着剤が必要

になることは自明である。この吸着剤安定供給のため、直接膜乳化法による

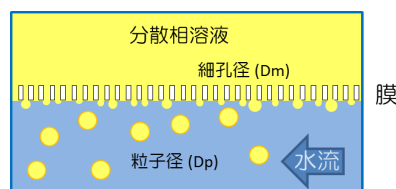


図8. 直接膜乳化法の原理

る合成を試みた。この方法は、油層をフィルターを介して水層に直接分散させていく方法であり、ここで生じる油滴の径 D_p は、細孔径 D_m の 3~4 倍とされている。今回、油的の粒径を整えるため、孔径が 0.15 mm の穴を開けたテフロン膜を東海光学(株)に作成していただいた(図 9)。この膜乳化法で得られた油滴を水層に懸濁させた後に加温を始めると、油滴は球状に固化しなかった。懸濁重合で重要な因子に油層と水層の比率があり、本システムでは

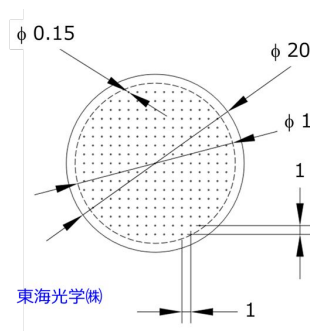


図9. 孔径の整ったフィルター

10 g 程度のモノマを固化させるための水層比としては過剰なために樹脂が球状化しなかったものと推察された。攪拌羽根でテフロン膜から油滴を分散させるためには 400 mL 以上の水層が必要であり、油層比が小さいまま重合させるために、加温水槽中での直接膜乳化法を検討した。水層量に比べて油滴が極めて少ないため、反応熱が他の油滴に伝播することなく、暴走は起こらなかった。この方法で得られた粒子径は、攪拌羽根の回転が小さくなるにつれ、大きくなった。0.15 mm のフィルターから粒径が 1 mm を超す粒子の作成も可能であった。何れの粒径でも、その分散度は 1.4 前後と安定していた。

(5) ルイス酸型吸着剤の開発

図 10 に Gef の構造式を示すが、一般に低分子化合物型分子標的薬は、複素環型の芳香族化合物で、 $\log P$ の大きな疎水性を示す。一般的な逆相系や陽イオン交換カートリッジに捕捉されるであろうが、生体中のマトリクス

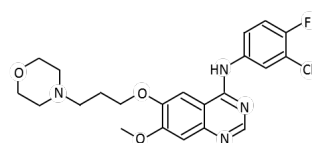


図10. ゲフィチニブの構造式

との分離ができない。キナゾリン環のように n 欠如系芳香環上の電子密度は低くなるが、分極率は高くなり、窒素原子の配位性が高まる。分子量は 500 Da に近く、基本的には非常にソフトな塩基と考えられる。このようなソフトな塩基を選択的に捕捉するには、ソフトな酸を官能基として持つ吸着剤が考えられる。ソフトな金属イオンとしては、 Au^+ や Hg^{2+} 、 Ag^+ があるが、金は高価、水銀は環境負荷が大きい。銀イオンを担持した吸着剤が、分子標的治療薬を特異的に捕捉するのではと考えた。

銀イオンを担持させる非イオン性官能基として、自身もソフトな塩基であればよい。電

子授与体型で分極率体積が大きく、非イオン性を代表する官能基が尿素構造である。より分極性を高めるため、中心の酸素原子を硫黄原子に置き換えたチオ尿素体を選択した。分子標的薬の吸着選択性を評価する目的で、チオ尿素基の隣には共役平面構造を有するナフチル基(Na-ITC)と、嵩高いシクロヘキシル基(CH-ITC)を導入した二種類の吸着剤を合成した(図11)。

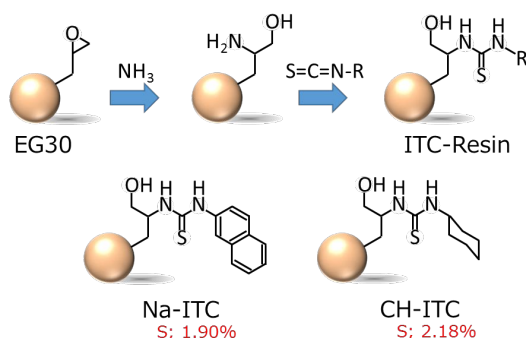


図11. チオ尿素型吸着剤の合成スキーム

これら樹脂の硫黄元素分析の結果、Na-ITCで全グリシジル基に対して28%、CH-ITCで32%のイソチオシアネートが導入されていた。更に、銀を担持した樹脂の銀元素分析では、このチオ尿素基に対しNa-ITCで約5割、CH-ITCで約6割の銀イオンが担持されていることが判明した。

これら吸着剤のGefに対する吸着特性を評価したところ、Na-ITCの方が良く捕捉した。これは、Gefがナフチル基との間でスタッキングを起こすのであろう。アセトニトリル中のGefは、Na-ITCにほぼ定量的に捕捉され、弱い配位能を持つメタノールで少しずつ脱着された。このメタノール溶出液中には銀イオンが含まれていなかった。10 mM 酢酸アンモニウム/メタノール溶出液では簡単に脱着された。この溶出液中にも銀イオンの漏出は認められなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

山本 敦、山本良平、川部 勤、呼吸からの不揮発成分の排泄 その機構と応用、ぶんせき(進歩総説)印刷中、査読有

T.Miwa, S.Suzuki, R.Takai, R.Yamamoto, Y.Inoue, A.Yamamoto, Retention behavior of halogenated benzenes on a stationary phase having 2,4-dibromophenoxy group as the halogen recognition functional group, *Anal. Sci.*, **31**, 841-845, 2015, 査読有

K.Arai, H.Terashima, S.Aizawa, A.Tagu, A.Yamamoto, K.Tsutsumiuchi, S.Kodama, Simultaneous determination of trigonelline, caffeine and chlorogenic acid in instant coffee by HPLC using an acidic mobile phase containing

octanesulfonate, *Anal. Sci.*, **31**, 831-835, 2015, 査読有

〔学会発表〕(計 10件)

日下部純平、小西真菜香、山本良平、山本 敦、松島充代子、川部 勤、呼吸を使ったTDMの可能性 ラット呼吸量を補正するための指標物質の探索、2018年、日本薬学会第138年会

小西真菜香、日下部純平、山本良平、山本 敦、松島充代子、川部 勤、呼吸から薬物ADMEは解明できるのか?2017年、第17回高山フォーラム

日下部純平、山本良平、山本 敦、松島充代子、川部 勤、膜乳化重合法を用いた呼吸エアロゾル中薬物吸着剤の合成と評価、2017年、第9回日本安定同位体・生体ガス医学応用学会大会

日下部純平、高井里奈、梶原 若、小崎大輔、山本 敦、SPG膜乳化法による均一性を持ったポリマー樹脂粒子径の制御、2017年、第66回高分子学会年次大会

谷畑壮磨、山本良平、山本 敦、東海林秀典、加藤祐史、下内章人、松島充代子、川部 勤、呼吸エアロゾルを代替血液としたTDMは可能か?2017年、日本薬学会第137年会

大澤磨末、高井里奈、山本良平、山本 敦、松島充代子、川部 勤、分子標的薬のための選択的吸着剤開発、2017年、日本薬学会第137年会

高井里奈、大澤磨末、三輪俊夫、山本良平、山本 敦、塩基性複素環系薬剤に対する新規吸着剤の開発、2016年、日本分析化学会第65年会

谷畑壮磨、山本良平、山本 敦、越智 悠、草次裕人、松島充代子、川部 勤、呼吸を使った非侵襲的TDM 呼吸エアロゾルの構造、2016年、第33回日本TDM学会・学術大会

越智 悠、松島充代子、小木曾寛希、大村綾、草次裕人、日置清香、山本良平、井上嘉則、山本 敦、川部 勤、呼吸に排出される薬物濃度の測定をもとにした治療薬物モニタリング法の探索、2015年、名古屋大学若手女性研究者サイエンスフォーラム

谷畑壮磨、日置清香、三輪俊夫、上茶谷若、井上嘉則、山本 敦、エアロゾル中難揮発性薬物用吸着剤の最適化、2015年、第75回分析化学討論会

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称:呼吸ミスト捕集装置、呼吸ミスト分析システム、呼吸ミスト捕集方法及び呼吸ミスト分析方法

発明者:加藤祐史、山本敦、他

権利者:東海光学(株)、学校法人 中部大学、国立大学法人 名古屋大学

種類:特許

番号:特願 2017-99147

出願年月日：平成 29 年 5 月 18 日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山本 敦 (YAMAMOTO, Atsushi)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60360806

(2)研究分担者

小玉 修嗣 (KODAMA, Shuji)

東海大学・理学部・教授

研究者番号：70360807

(2)研究分担者

川部 勤 (KAWABE, Tsutomu)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20378219

(2)研究分担者

松島 充代子 (MATSUSHIMA, Miyoko)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：10509665