

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15512

研究課題名（和文）アルブミンの質的変動を基盤とした抗MRSA薬TDMへの展開

研究課題名（英文）Development of therapeutic drug monitoring for anti-MRSA agents based on qualitative changes in albumin

研究代表者

田中 遼大 (Tanaka, Ryota)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：30781736

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高齢化の進行と共に罹患率が上昇している糖尿病（DM）および慢性腎臓病（CKD）時のアルブミンの質的変動とダプトマイシン（DAP）およびテイコプラニンのタンパク結合率との関連性を明らかにすることを目的とし、総・遊離型濃度測定系の確立、DMおよびCKD時の病態下を想定したIn vitroにおけるタンパク結合率の算出を試みた。その結果、UPLC-MS/MSを用いたDAPの広範囲かつハイスループットな総・遊離型濃度測定系の開発に成功した。また、DMおよびCKDの病態下を想定したタンパク結合の検討より、アルブミンの質的変動はDAPのタンパク結合率に影響を与えない可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立したダプトマイシン（DAP）の測定法は総濃度、遊離型濃度ともに過去の報告と比較して検量線範囲が広く、低用量単回投与時のトラフ値も高用量繰り返し投与時の最高血中濃度も測定可能になった。これにより遊離型濃度を指標としたDAPによるTDMが可能となった。また、DAPは臨床で認められる濃度において、タンパク結合率に飽和現象を認めないこと、酸化修飾体や糖化修飾体の増加による構造変化の影響を受けないことが確認された。そのため、糖尿病や慢性腎臓病時にダプトマイシンの遊離型濃度は変動しない可能性が示唆され、アルブミンの質的変動を考慮した投与設計をする必要はないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify the association with a protein binding rate of daptomycin or teicoplanin and qualitative changes of albumin in diabetes or chronic kidney disease, which have an increased prevalence as the population ages. We tried to develop measurement method of total and free daptomycin concentration and calculate the in vitro protein binding rate in assumed disease state of diabetes and chronic kidney disease. The wide range and high throughput method of total and free concentration for daptomycin using ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry was successfully developed. Furthermore, the examination of protein binding in the assumed disease state of diabetes and chronic kidney disease suggested that qualitative changes of albumin in these diseases did not affect the protein binding rate of daptomycin.

研究分野：薬物動態、臨床化学

キーワード：アルブミン ダプトマイシン タンパク結合 質的変動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日進月歩に目まぐるしい発展を遂げてきた医療において、感染症領域は今危機的状況に直面している。抗菌薬の開発状況の鈍化に加えて、不適切な使用に伴う耐性菌の増加により、2050年には耐性菌による死者数は世界中で年間1千万人に及ぶ可能性が指摘されている。このような中、今ある抗菌薬、特にカルバペネム系薬や抗MRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)薬をはじめとした耐性菌に対してもスペクトルを示す広域抗菌薬を適正かつ効果的に使用することが重要視されるようになった。本邦で承認されている抗MRSA薬の一部(バンコマイシン、テイコプラニン(TEIC)、アルベカシン)は、有効性を担保し副作用を回避する目的で治療薬物モニタリング(TDM)が推奨されている。また近年では、リネゾリドおよびダプトマイシン(DAP)についても血中濃度と効果や有害事象との関連性が注視されているように、TDMは抗菌薬の適正使用を推進する上で重要なツールになりつつある。

通常のTDMで測定される血中濃度は、血漿中に存在するタンパク質と結合した薬物とタンパク質に結合していない遊離型薬物とを合算させた総濃度で表示される。しかしながら、実際に生体内で細菌に対して効力を発揮する薬物も正常細胞に毒性を示す薬物も血漿タンパク質に結合していない遊離型薬物である。基本的にタンパク結合率は変動しないため、総濃度の変動に応じて遊離型濃度も同様に変動すると考えられているが、病態時にタンパク結合率が変動する場合はその限りでない。特に近年では、糖尿病(DM)や慢性腎臓病(CKD)時にアルブミンの構造が変化し、薬物のリガンド結合能が低下することが明らかとなってきた。つまり、上記の病態時には薬物の遊離型濃度が上昇し、TDMにおいて同じ総濃度であっても薬物の効果や副作用の発現頻度に影響を与える可能性が伺える。抗MRSA薬のうちTEICとDAPは血中タンパク結合率が90%以上と高い。そのため、上記の病態時には「アルブミンの質的変動」を考慮し、遊離型濃度をモニタリングする方がより正確に有効性や毒性を判断できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、高齢化の進行と共に罹患率が上昇しているDMおよびCKD患者に対してDAPおよびTEICを効果的に使用する上での初期投与設計ならびにTDMへと展開することを将来的な目標とした。そのための基礎的な知見として、病態時のアルブミンの質的変動とDAPおよびTEICのタンパク結合率との関連性を明らかにすることを目的とし、高感度な総・遊離型濃度測定系の確立、CKD時の病態下を想定したIn vitroにおけるタンパク結合率の算出を試みた。

3. 研究の方法

(1)超高速高分離クロマトグラフ-タンデム型質量分析法(UPLC-MS/MS)を用いたDAPの高感度な総・遊離型濃度測定系の確立

まず、各種溶媒による吸着性を検討した結果、DAPは超純水または20%MeOH溶液ではPolypropylene tubeにほとんどが吸着を示し、100%MeOH溶液ではScientific glasswareに一部吸着性を示した。その一方で、50%MeOH溶液では両容器に対する吸着性を示さなかったため、StockおよびWorking solutionに用いた。遊離型濃度の分離には限外濾過法を選択し、100%MeOHをReceiver cupへ添加することで、表面へのDAPの吸着を回避した。各種条件検討の結果、サンプルの前処理にはハイスルーブットかつ、回収率の優れたOasis® 96 well MCX μ Elution plateを用いた固相抽出法を選択した。測定はAcquity UPLC I-Class Systemおよびタンデム四重極型質量分析計を用いた。UPLC用のカラムはACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μ m, 2.1 \times 50mm)を選択した。移動相は0.1%ギ酸水溶液および0.1%ギ酸を含むアセトニトリルから構成され、グラジエントをかけることにより目的物質の早期検出を行った。内部標準物質にはDAPの重水素体(DAP-d5)を用いた。MS条件はMultiple reaction monitoring分析により決定し(DAP: 810.87 159.10, DAP-d5: 813.71 163.00) positive ion modeでDAPの[M + 2H]²⁺シグナルが最も強度が高いことを確認した。フルバリデーションはFDAおよびEMAが作成したBioanalytical method validationのガイダンスに準拠し、日内変動、日間変動における精度、真度および正確度、回収率、マトリックス効果、選択性、安定性を評価した。なお、検量線は既報より、高用量投与時のC_{max}と低用量投与時のC_{trough}を測定可能な範囲とした。大分大学医学部附属病院集中治療部(ICU)にて、DAPが投与された患者2例の投与開始後3日目および5日目における点滴開始30分(C_{max})および点滴開始24時間後または48時間後(C_{trough})に採血を行い、血漿中濃度を測定することで臨床適応性を評価した。なお、本研究は大分大学医学部倫理委員会による承認を受け(承認番号: 1099)、患者またはその代諾者より文書による同意を得た後に実施した。

(2)CKD時の病態下を想定したIn vitroにおけるタンパク結合率の算出

DAPの総・遊離型濃度は(1)で確立したUPLC-MS/MSを用いて測定し、両濃度の測定結果からタンパク結合率を算出した。CKD時には酸化修飾型アルブミン(Cys-Cys34-HSA)の割合が上昇することが報告されている。そのため、アルブミン溶液および健常人血漿を用いてL-システインおよび過酸化水素をそれぞれ最終濃度が1.5 mMおよび0、10、100、1000 μ Mとなるように添加し、37℃で48時間および168時間インキュベートすることでCys-Cys34-HSAを調製した。アルブミン溶液中および血漿中のCys-Cys34-HSAは固相抽出カラム(Bond Elute C18 EWP, 50mg/mL)を用いて前処理後、エレクトロスプレーイオン化-飛行時間型質量分析計(ESI-TOFMS)

を用いて測定した。アルブミンの構造はピークインテンシティの最も高い51個のスペクトルを用いて、MaxEnt法によるデコンボリューション処理後、1個のイオンに再構築することで解析した。Cys-Cys34-HSAおよび還元型HSAのピーク比より、Cys-Cys34-HSAの割合を算出した。

4. 研究成果

(1) 超高速高分離クロマトグラフ-タンデム型質量分析法(UPLC-MS/MS)を用いたDAPの高感度な総・遊離型濃度測定系の確立

6名の健常成人のplasmaおよび限外濾過後のplasmaを用いて、確立した総・遊離型濃度測定系における選択性を確認した。Blank plasmaにおける最大イオン強度は定量下限濃度(LLoQ)における強度と比較明らかに低値を示し、またDAPおよびDAP-d5のRetention timeに干渉ピークは認められなかった。加えて、LLoQ、高濃度QCおよび患者検体のいずれにおいても単一かつシャープなピークが検出されたことから、本測定系における選択性が証明された。次に、実濃度とDAP/DAP-d5のピーク面積で表されるレスポンスとの相関係数を算出したところ、総濃度は0.5-200 µg/mLの検量線範囲で優れた数値を示し($R^2 \geq 0.9988$)、遊離型濃度は0.04-40 µg/mLの検量線範囲で優れた数値を示した($R^2 \geq 0.9933$)。また、Method linearityを確認したところ、総・遊離型濃度ともに良好な直線性が確認された(総濃度: $R^2 \geq 0.9980$ 、遊離型濃度: $R^2 \geq 0.9912$)。総濃度のLLoQは日内・日間変動ともに良好な精度(日内: $\leq 4.28\%$ 、日間: 7.21%)、真度(日内: $\leq 12.80\%$ 、日間: 4.71%)および正確度(日内: $\leq 18.11\%$ 、日間: 16.60%)を示した。また、遊離型濃度のLLoQは日内・日間変動ともに良好な精度(日内: $\leq 11.73\%$ 、日間: 7.82%)、真度(日内: $\leq 10.00\%$ 、日間: 8.24%)および正確度(日内: $\leq 25.19\%$ 、日間: 21.14%)を示した。また、全てのLLoQのシグナルがBlank plasmaで検出されたシグナルの5倍以上であることを確認した。総濃度では、QCA-Cの日内変動における真度は絶対値8.33%以内、精度は4.38%以下、正確度は13.21%以下であった。一方、日間変動における真度も絶対値1.04%以内と良好で、精度は6.14%以下、正確度は11.18%以下であった。遊離型濃度では、QCA-Cの日内変動の真度は絶対値9.79%以内で、精度は3.47%以下、正確度は13.09%以下であった。一方、日間変動における真度は絶対値4.44%以内と良好で、精度は5.51%以下、正確度は10.97%以下であった。総・遊離型濃度の各QCは、精度、真度および正確度のいずれにおいても、日内・日間変動ともにFDAおよびEMAガイダンスの基準を満たした。総・遊離型濃度ともにQC間でマトリックス効果(総濃度:113.4-118.8、遊離型濃度:104.4-127.1)および回収率(総濃度:57.2-67.6、遊離型濃度:54.3-61.2)に顕著な違いは認められず、概ね一定の数値であることが確認された。遊離型薬物の限外濾過に対するDAPの回収率を確認したところ、100.0-102.2%であることが示され、限外濾過膜への吸着性を示さないことが証明された。5のオートサンプラー内での24時間における安定性および凍結融解を3回繰り返した際の安定性を評価した結果、遊離型濃度の凍結融解以外の安定性は問題ないことが確認された。ただし、遊離型濃度についても、1回の凍結融解までは許容できることを確認した。2名のICU患者の投与開始3日目および5日目におけるC_{max}、C_{trough}の総・遊離型濃度を測定したところ、いずれにおいても検量線範囲内であり、本測定系の臨床適応性が確認された。また、ICU入室患者2例におけるDAPの遊離型分率を算出したところ、CCr:17.5 mL/minの症例は平均0.076、CCr:140.5 mL/minの症例は平均0.039と腎障害者で2倍程度高値を示した。

(2) CKD時の病態下を想定したIn vitroにおけるタンパク結合率の算出

各濃度(2、5、10、20、40、80 µg/mL)においてIn vitroでのタンパク結合率を算出した結果、DAPのタンパク結合率は97.5-97.9%と、濃度非依存的に概ね一定であり、臨床で確認される濃度において飽和が認められない可能性が示唆された。アルブミン溶液および健常人血漿にL-システインを添加することでCys-Cys34-HSA ratioの上昇が確認された。また、CKD時には生体内の活性酸素種量が増加しており、それによりシステイン付加が亢進する可能性が考えられている。そのため、過酸化水素を10、100、1000 µMとなるように添加し同様な検討を行った。その結果、100 µM以上でCys-Cys34-HSA ratioの顕著な上昇が確認でき、過度にシステインが付加されたアルブミン溶液の作製に成功した。調製した各種酸化修飾型アルブミン溶液において、DAPのアルブミン結合率を確認した。なお、既報よりDAPは分解しやすいことが報告されているため、本検討を実施する前にL-システインや各濃度における過酸化水素がDAPの構造に与えるか確認したが、影響は認められなかった。アルブミン溶液中の結合率は80-83%程度であったが、酸化修飾型アルブミン溶液中の結合率も同程度であり、DAPは酸化修飾に伴うアルブミンの構造変化によりタンパク結合率に影響を受けないことが明らかとなった。また、健常人血漿を用いた検討においても同様に、DAPのタンパク結合率は影響を受けないことが確認され、CKD時におけるタンパク結合率の低下にアルブミンの構造変化は関係ないことが示唆された。なお、糖化型アルブミンにおいても同様な検討を実施し、DM時にも影響を受けない可能性を確認した。

また、TEICについては、UPLC-MS/MSおよびHPLCを用いて、高感度な総・遊離型濃度の確立を試みたが、研究期間内に低濃度の遊離型濃度まで測定可能かつFDAおよびEMAガイダンスの基準を満たす系が確立できなかった。今後も継続して検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Tanaka R, Imafuku T, Suzuki Y, Nishida K, Matsusaka K, Shin T, Sato Y, Ishima Y, Watanabe H, Mimata H, Maruyama T, Itoh H. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Changes in redox state of albumin before and after kidney transplantation in patients with end-stage renal disease. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Clin Biochem | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.clinbiochem.2020.04.010. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Tanaka R, Suzuki Y, Goto K, Yasuda N, Koga H, Kai S, Ohchi Y, Sato Y, Kitano T, Itoh H. | 4. 巻 165 |
| 2. 論文標題 Development and validation of sensitive and selective quantification of total and free daptomycin in human plasma using ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Pharm Biomed Anal | 6. 最初と最後の頁 56-64 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpba.2018.11.047. Epub 2018 Nov 22. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 田中遼大, 鈴木陽介, 後藤孝治, 大地嘉文, 甲斐真也, 安部隆国, 古賀寛教, 安田則久, 佐藤雄己, 北野敬明, 伊東弘樹 |
| 2. 発表標題 UPLC-MS/MSを用いた総・遊離型ダプトマイシンの高感度同時定量法の開発 |
| 3. 学会等名 第35回日本TDM学会・学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ryota Tanaka, Tadashi Imafuku, Yosuke Suzuki, Fuminori Sato, Yuhki Sato, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, Hiromitsu Mimata, Toru Maruyama, Hiroki Itoh |
| 2. 発表標題 Impact of kidney transplantation on redox state of albumin in patients with end-stage renal disease |
| 3. 学会等名 第12回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 刀祢一星, 田中遼大, 鈴木陽介, 佐藤雄己, 伊東 弘樹 |
| 2. 発表標題 ダブトマイシンの遊離型分率に与えるアルブミンの質的変動の影響評価 |
| 3. 学会等名 第66回日本化学療法学会西日本支部総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田中 遼大 |
| 2. 発表標題 UPLC-MS/MSを用いた総・遊離型ダブトマイシンの高感度同時定量法の確立 |
| 3. 学会等名 第35回日本TDM学会・学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|-------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 田中遼大 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 一般社団法人日本TDM学会 | 5. 総ページ数 4 |
| 3. 書名 TDM研究 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | | | |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|