

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 8 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670070

研究課題名(和文) 臨床試験における極微量採血による薬物動態解析の実現

研究課題名(英文) Development of Micro-blood-sampling Method for Pharmacokinetic Analysis in Clinical Studies

研究代表者

樋坂 章博 (Hisaka, Akihiro)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80420206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小児では適正用量の不明な薬剤が多く大きな問題となっている。本研究では小児の用量設定を科学的に行う方法の整備を進めつつ、最終的には小児の臨床試験実施の困難を除くため、微量採血で薬物濃度評価が可能な方法の確立を目的とした。これまで微量を濾紙に採取し乾燥させた後に分析するDried blood spot (DBS)法は、採取血液量の正確性が乏しい、また全血中濃度となるため一般的な血清中濃度との比較が難しいとの欠点があったが、本研究では血液中の内因性物質を同時測定し薬物濃度を補正する方法を新規に開発した。その結果、5~20 µL程度の微量の全血からでも血清中薬物濃度の正確な評価が可能となった。

研究成果の概要(英文)：It is a serious clinical problem that pediatric dosages are not determined based on scientific evidences. The objective of this study is to develop a micro-blood-sampling method which enables pharmacokinetic studies in pediatric populations. At the same time, we pursued reasonable methods for calculation of pediatric dosages. We improved the dried blood spot (DBS) method in which drug concentrations are determined from DBS on a filter paper. Preciseness of the DBS method has been restricted because sampling volume is unstable. We corrected the volume by measuring the concentration of control internal substances. The result indicated that serum drug concentrations can be estimated precisely from 5~20 µL of blood by using the developed method.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：小児薬用量 薬物動態学 DBS LC-MS/MS モデリング クリアランス 臨床試験

1. 研究開始当初の背景

Pharmacokinetics(PK)解析のための薬物血中濃度のモニタリングは一般に血漿中濃度あるいは血清中濃度により行われ、一般には5~10mL程度の採決が必要となる。これは通常の医療行為と比較して特に被験者への侵襲の大きな採血量ではないが、小児、特に乳幼児の場合には過剰な負荷となる。また、成人の場合でも多数回の採血が必要な場合には不可が大きく、これが第相以降の臨床試験においてPKモニタリングが最小限度に留められる原因の1つとなっている。

小児(幼児、乳児、未熟児を含む)における薬の効果・安全性と適正用量に関する情報の不足は、臨床的に極めて深刻な問題であり、我国の大学病院で小児に処方された薬剤のうち、小児の用法用量が添付文書に記載されているものは16%に過ぎず、逆に小児への安全性は未確立、さらには小児への使用は禁忌であるものが、それぞれ39%および5%も含まれると報告されている(大西ら、小児科臨床 54:445-53)。我々の先行研究で小児の用量に設定について調査した結果でも、本邦で承認されている2000成分以上の薬剤の中で、2~12歳の小児での用量設定されているものは326剤に過ぎず、1ヶ月~2歳の乳児では109剤、新生児に至っては16剤に過ぎなかった。

従って、薬物血中濃度を実際に小児で測定し、それを成人の情報と比較することで適正な用量設定ができるならば、临床上のメリットは極めて大きい。小児の用量設定は体重や体表面積を利用した換算式が幾つか報告されているが、特に出生直後から2歳までは、肝臓、腎臓の機能が著しく発達する時期であり、そのような換算式の精度は極めて悪く、我々を含めて臓器機能の発達曲線を考慮した生理学的薬物速度論モデル解析が複数発表されているが(2011年日本薬剤学会など)、これらの解析を血中濃度を実測することで検証する必要がある。

一方で、新薬開発時にはマウス、ラットなどの小動物を用いて安全性試験を実施することが多いが、その時に安全性に関連した症状が出現したときの薬物血中濃度を評価しておくことは、後に臨床試験を安全に実施するために大変重要な意味を持つ。この場合に薬物濃度測定のために採血量を増やすと、その時点で動物を処分する必要を生じ、動物愛護上も少なからぬ問題となっている。少量のサンプリングで薬物濃度の精度の良い測定が可能になると、このような非臨床実験の問題の解決にもつながる。

本研究はそのような背景に基づき発案された。微量採血に基づきPK評価を行う方法としては、15~100 μ L程度の全血を濾紙に染み込ませ、これを乾燥させて保存した後に、これから抽出して機器分析するDried blood spot(DBS)法がすでに報告されている(Millership JS, Pediatric Anesthesia,

21:197-205, 2011)。DBS法の利点としては、採血量を少量に抑えられるだけでなく、血漿分離が必要なく操作が簡便なこと、輸送や保存の際に冷却や特別な容器が必要なくコスト削減につながる事が挙げられる。DBS法についてはすでにそのメリットが広く知られ、多くの論文も発表されているが、実用的な臨床試験では全く用いられていない。その理由として、分析に用いられる血液量が試料採取時の技術や濾紙へのしみ込み方などに影響されて一定とならない、血液中の血球成分の割合(ヘマトクリット値:Ht)が被験者や検体により異なり、それが全血中薬剤濃度の血漿中薬剤濃度への換算精度に影響するなどの要因で、測定精度に問題があることが挙げられる。これらの要因は論文等ではあまり取り上げられないが、実際の実験者は意識していることが多く、我々も予備検討時にこれらを解決しないと実用的には測定を実施できないと認識した。

2. 研究の目的

本研究では微量採血によるPKモニタリングの必要性を考慮し、これを実現するための方法として様々な可能性を考慮し、DBS法について問題を解決し精度を高めることが最も有用性が高いと判断し、その方法を新たに開発することを目的とした。具体的には、血漿中のNa濃度は血球中に比べて著しく高く、また135~145mEq/Lに一定に保たれているのに対し、赤血球中のK濃度は血漿中に比べて150~160mEq/Lと高いことを利用し、薬物濃度と同時にNaおよびK濃度を測定し、その結果で分析に用いられる血液量およびHt値を計算して補正することで、薬物血漿中濃度を精度良く求める方針とした。なお血球中Na濃度、血漿中のK濃度はいずれも10mEq/L以下と非常に低い。

Dried Blood Spot (DBS)



DBS法の利点

- ・必要採血量が少なく侵襲性が低い
- ・操作が簡便である
- ・長期安定性を示す薬物が多い

3. 研究の方法

DBS法は臨床の現場で医療従事者が採決し、直ちに濾紙にスポットする方法であるために、スポット量が一定になりやすく、そのため値の再現性が乏しい。また、分析はスポットから有機溶媒なので直接抽出して行われるので、濃度として全血濃度となる。

Sprague-Dawleyラットから採血した血液にTDMなどで血中濃度が測定されるquetiapine, theophylline, phenytoin, carbamazepineを選択して添加し37で15

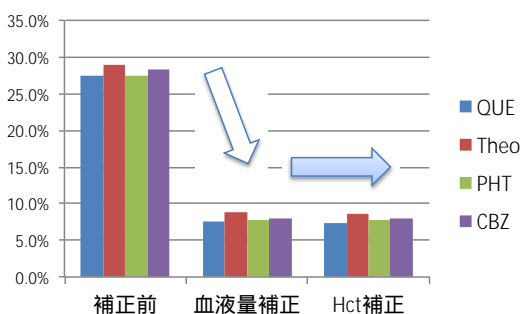
分間インキュベートした後、DBS カードへ一定量ずつ血液を添加し、2 時間以上乾燥させた。乾燥後、カードから血痕を専用のパンチで切り取り、アセトニトリルを用いて除タンパク処理し、さらに遠心した上清を、遠心減圧濃縮して乾固し、内部標準物質を加えた移動相に再溶解して LC-MS/MS にて測定した。移動相としては 0.1%ギ酸-アセトニトリルの混合液を用いてグラジエント溶出を行った。LC-MS/MS 測定後の試料をサンプルチューブから回収し、イオン選択性電極法により、検体中の Na 濃度および K 濃度を測定した。

実験は Hct 値、添加血液量、血中濃度の影響を考慮するため、Hct 値(高、低)、血液量(10, 15, 20 μ L)、血中濃度(Low, Middle, High)条件で検討した。なお、いずれの薬剤も常法に従いラットの全血を用いて血漿血球分配率を測定しておいた。Na および K 濃度から検体の血漿量および血球量を算出し、その値で血液量および Hct を補正した。

4. 研究成果

図 1 に示すように、血液量および Hct の補正を行うことで、測定精度は著しく改善した。なお、今回の結果では Hct 補正による効果は比較的小さかったが、これは薬物の全血血漿分配率が著しく高いか低い薬剤の場合に差を生じるが、今回実施した薬物にそのようなものが含まれていなかったことから、予想された結果である。調製したサンプルに対して正しく Hct 値は測定されており、そのような薬剤であれば、精度は改善すると予想される。

図 1 測定精度に及ぼす濃度補正の効果



検討を行った、quetiapine, theophylline, phenytoin, carbamazepine の添加検量線を図 2 および 3 に示すが、いずれも Hct の補正により検量線の傾きがほぼ 1 となっており、測定精度が改善した。

図 3 測定精度に及ぼす補正の影響 (2)

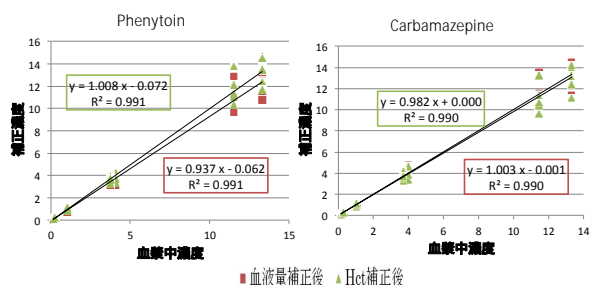
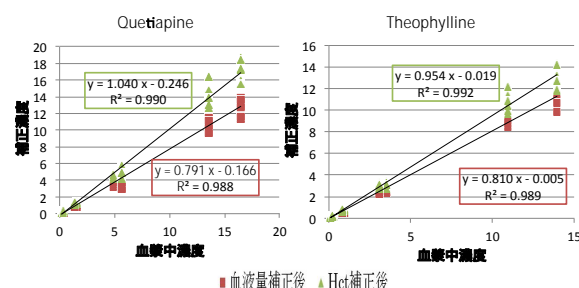


図 2 測定精度に及ぼす補正の影響 (1)



以上より、本研究で開発した Na および K 濃度を用いて DBS 法で測定された薬物濃度を補正することで、これまで得られなかった精度で正しく少量の試料から薬物濃度の評価が可能となった。

なお、本研究は特許出願の可能性を考慮して発表等を行っていなかったが、経済性などを考慮して出願は行わずに、むしろ公表して普及を図る方針とした。従って、学会等の発表は今後行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋坂章博 (HISAKA, Akihiro)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：80420206