

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659066

研究課題名(和文) 乳児・新生児に適用可能な非侵襲的薬物濃度モニタリング技術の開発

研究課題名(英文) Development of non-invasive therapeutic drug monitoring method for pediatric patients

研究代表者

山本 康次郎 (Yamamoto, Koujiro)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70174787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：非侵襲的な血中濃度モニタリングを実現するためには、わずかな侵襲で得られる微量試料を用いた高感度測定法が必要である。また血液試料を血漿と血球に分離しないスポット法などを利用する必要があり、非侵襲的血中濃度モニタリングによる測定値と従来の血漿中濃度との関係を評価するためには薬物の血球移行を正確に評価しておく必要がある。本研究により、抗HIV感染症治療薬ダルナビルの高感度微量定量法を確立し、血中および血球細胞中ダルナビル濃度の測定が可能になった。血球中/血漿中ダルナビル濃度比には大きな個人差が認められ、何らかの薬物輸送担体の個人差の寄与を考慮する必要があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The highly sensitive measurement method with very small amount of sample is essential for a noninvasive therapeutic drug monitoring. In addition, blood sample is not separated to plasma and blood cell in spot sampling, which is usually utilized for small amount blood sampling. Therefore, the evaluation of the distribution of drug to blood cell is necessary to understand the relationship of measured concentration with noninvasive sampling and conventional blood sampling. In this study, we established the highly sensitive quantitation method for darunavir, an anti HIV drug to determine the drug concentration in blood and blood cell. Large inter-individual variability was observed in blood cell / plasma concentration ratio of darunavir, which suggests the contribution of some drug transporter function.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：薬物濃度モニタリング 高感度微量定量法

1. 研究開始当初の背景

小児を対象とした非侵襲的サンプリングによる薬物濃度モニタリングとして、尿中薬物量(代謝物を含む)の測定や唾液中濃度測定が試みられてきた。前者は体内に吸収された薬物量の指標として有用であるが、尿中排泄量を決定するためには蓄尿した全尿量と尿中薬物濃度を測定する必要があり、現実的ではない。また、詳細な薬物動態解析に耐えるサンプリングは困難である。後者は血中非結合型薬物濃度を反映している利点があるものの、一定量のサンプリングにはかなりの時間を要し、頻回のサンプリングは困難である。さらに、経口投与時には服用した薬剤の混入による異常高値が得られる危険性も高い。微量の血液検体から薬物を定量する手法も試みられており、ヘマトクリット管などで採取したマイクロリットルオーダーの血漿でモニタリングすることが可能である。近年注目されているスポットサンプリングでは、微量の血液を試験紙に染み込ませ、その一定面積に含まれる薬物量から血中濃度を推定する。しかし、痛みを伴う操作を繰り返し行うことは困難であり、薬物動態解析に耐えるサンプリングは難しい。スポットサンプリングでは、試験紙に染み込んだ血液量のバラつきによる誤差が避けられず、何らかの補正手段が必要である。また、毛細血管中の薬物濃度が静脈血管中濃度と異なる可能性も否定できない。さらに、チップ式マイクロニードルによるサンプリングで得られる検体は細胞外液であり、その薬物濃度は必ずしも血中濃度とは一致しない。これらの手法の精度を評価して問題点を整理し、呼気濃縮検査用の検体や経皮的モニタリングなどの可能性も含めて新しい手法を探索し、高精度で連続サンプリングが可能な非侵襲的モニタリング技術を確立する。

2. 研究の目的

抗HIV薬、抗凝固薬などを対象として、UPLC、LC-MS/MS等を用いた超高感度定量法を確立する。チップ式マイクロニードルを用いて採取した細胞間液、液体窒素トラップによって採取した濃縮呼気、体内から逆流する薬物をトラップする貼付剤基剤などに回収される薬物を測定する。これらの非侵襲的サンプリング法により得られた薬物濃度と、従来の血中薬物濃度との関係を明らかにし、非侵襲的サンプリング法によるTDMの理論を構築することが本研究の目的である。通常のTDMでは血漿中薬物濃度が用いられるのに対し、非侵襲的サンプリングでは血球を含む全血中薬物濃度、細胞間液中薬物濃度などを測定することになるため、血漿中濃度と必ずしも一致するとは限らない。これらの関係を明らかにするためには、血漿から血球細胞

や細胞間液への薬物移行を考慮する必要がある。

血漿から細胞内への薬物移行は薬物輸送体による制限を受けている可能性が考えられるため、その影響を評価する必要があり、*in vitro*試験系で薬物の細胞内取り込みを評価する。また、薬物が血漿中から細胞間液や組織細胞内への移行に時間的な遅れが存在する場合は効果コンパートメントモデル解析あるいはモデル非依存的解析により測定値と真の血中薬物濃度との関係を明らかにする。

最終的には、新たなサンプルを用いた薬物濃度測定値が薬効評価の指標となりうるかどうかを検討し、非侵襲的TDMの有用性を評価することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 微量薬物定量法の確立

抗てんかん薬(フェニトイン、フェノバルビタール、バルプロ酸、ラモトリギン)、免疫抑制剤(シクロスポリン、タクロリムス、ミコフェノール酸)および抗HIV薬(リトナビル、ダルナビル、アタザナビル、サキナビル)、抗凝固薬(ワルファリン、ダビガトラン、リバロキサパン)、糖尿病治療薬(グリベンクラミド、グリクラジド、グリメピリド、シタグリプチン)などを対象薬物として、LC-TOF-MSまたはLC-MS/MSを用いた超高感度定量法を確立する。TOF-MSあるいはLC-MS/MSによる検出条件を探索し、薬物を検出するのに必要な絶対注入量を明らかにする。質量分析装置を用いることにより、サンプル量を0.1 μ L程度まで減少させる。

(2) 血漿と他の試料との濃度に差を引き起こす原因の解明

スポット法では試料として毛細血管から得られた全血を用いることから、特に薬物の血球移行を考慮することが重要である。そこで、ヒト単核球細胞を単離して*in vitro*における薬物取り込み実験を行い、薬物の血球移行に影響を及ぼす因子を検討する。

4. 研究成果

(1) 本研究では抗HIV薬ダルナビルを対象として蛍光検出による高感度測定法を確立し、ヒト血漿中およびヒト単核球中の薬物濃度を測定可能であることを示した。実際にダルナビルを投与されている患者の血漿中および単核球中ダルナビル濃度を測定したところ、単核球中/血漿中濃度比に非常に大きな個体差があり、薬物の血球移行に關与する薬物トランスポータの機能に大きな個人差があること、これが臨床効果の大きな個人差の原因になっていることが示唆された。また、単核球中/血漿中濃度比が併用薬物により

大きく影響を受けることが示された。
このことは、通常の採血後に血漿分離して測定した血漿中薬物濃度と、スポット法により測定される全血中濃度との関係に薬物輸送担体の機能が影響することを示唆している。ダルナビルの単核球中への移行は、一般に併用薬として用いられるリトナビルの影響を強く受けることが示され、これはリトナビルの MDR1 阻害作用によるものであると考えられる。抗 HIV 薬の作用点は免疫担当細胞内であることから、従来の血漿中薬物濃度モニタリングでは薬効の評価が難しく、むしろ血球細胞中濃度も反映する全血中濃度が適している可能性も考えられた。しかしながら、現時点で単核球中薬物濃度と HIV 抑制作用との関係は十分に解明できておらず、さらなる検討が必要である。

(2) 抗凝固薬であるダビガトランエテキシラートの微量定量法を開発し、血中濃度と効果の関係を検討した。抗凝固薬投与時には凝固能測定を行うことが多いため、さまざまな臨床状態におけるサンプリングを行うことが容易であり、しかも血漿と血球を分離して得ることが可能である。ダビガトランエテキシラートは MDR1 の基質であることから、ダルナビルと同様に血球への移行が MDR1 により制限を受けている可能性が高く、サンプルの種類により濃度が異なる可能性が考えられる。
このことを確認するための臨床研究が現在進行中である。

(3) その他、リトナビル、アタザナビル、サキナビルなどの抗 HIV 薬、ワルファリン、リバロキサパンなどの抗凝固薬、シタグリブチンなどの糖尿病治療薬、イマチニブ、スニチニブなどの分子標的抗がん薬の微量定量法がほぼ確立しており、血球/血漿濃度比の個人差を検討中である。血球移行に薬物輸送担体が関与する薬物についてはスポット法による濃度測定値の解釈に注意が必要である。
また、スポット法ではろ紙に吸収されたサンプル量を補正する必要があり、腎機能障害時など生理的条件の変化による影響も考慮する必要が考えられる。

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1件)

Nagano D, Araki T, Nakamura T, Yamamoto K: Determination of intracellular darunavir by liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatographic Sciences, 52: 1021-1025 (2014) 査読有

[学会発表](計7件)

Kaneta A, Araki T, Taira M, Aomori T, Nagano D, Arai M, Nakamura T, Kurabayashi M, Yamamoto K: Administration of dabigatran with decapsulation.. 18th Congress of the European Association of Hospital Pharmacists.. Mar 13-15, 2013, Paris, France.

平良麻里、金田亜季子、荒木拓也、青森 達、永野大輔、新井昌史、中村智徳、倉林正彦、山本康次郎: ダビガトランを脱カプセルして経管投与した症例の血中薬物濃度解析. 第77回日本循環器学会学術集会コメディカルセッション、2013年3月17日、横浜

Nagano D, Araki T, Yanagisawa K, Hayashi T, Ogawa Y, Nojima Y, Nakamura T, Yamamoto K: Intracellular concentration of darunavir as an indicator for the clinical efficacy in HIV patients. 11th Conference of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, August 30, 2013, Geneva, Switzerland.

永野大輔、荒木拓也、金田亜季子、平良麻里、金古善明、倉林正彦、山本康次郎: ダビガトラン血中濃度とaPTT値の相関性における採血時間の影響. 第57回日本薬学会関東支部大会、2013年10月26日、東京

柳沢邦雄、小川孔幸、林俊誠、馬渡桃子、合田史、内海英貴、永野大輔、荒木拓也、山本康次郎、石崎芳美、野島美久: Darunavir 増量を含むレジメン変更が髄液・血中 HIV-RNA 量の低下と認知機能改善に寄与した一例. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会、2013年11月20日、熊本

Nagano D, Araki T, Yanagisawa K, Hayashi T, Ogawa Y, Nojima Y, Nakamura T, Yamamoto K: The factors acting for the clinical efficacy of darunavir and the intracellular concentration of darunavir in HIV patients. 第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2013年11月23日、仙台

Nagano D, Araki T, Yanagisawa k, Hayashi T, Ogawa Y, Nojima Y, Nakamura T, Yamamoto K: Effect of MDR1 genotype on the intracellular concentration and the clinical efficacy of darunavir in HIV patients. American Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics 2014 Annual Meeting. Mar 18-22, 2014, Atlanta, GA, USA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://clinpharmacol.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本康次郎 (YAMAMOTO, Koujiro)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70174787

(2)研究分担者

坂下真大 (Hashita, Tadahiro)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20613384

青森 達 (Aomori, Tohru)

慶応義塾大学・薬学部・講師

研究者番号：40620802

(3)連携研究者

()

研究者番号：