

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890244
 研究課題名（和文） テーラーメイド治療を指向した抗真菌薬の血中濃度簡易測定法の開発と遺伝子多型解析
 研究課題名（英文） Development of a simple analytical method for the determination of blood level of antifungal drugs and a genetic polymorphism analysis for individual treatment
 研究代表者
 下枝 貞彦（SHIMOEDA SADAHIKO）
 東京薬科大学・薬学部・准教授
 研究者番号：40515087

研究成果の概要（和文）：抗真菌薬であるポリコナゾール（VRCZ）およびミカファンギンのカラムスイッチング HPLC を用いる簡便な定量法を確立した。この測定法を実サンプルに応用したところ、肝機能障害の発生が危惧される血中濃度のトラフ値 $4.5 \mu\text{g/mL}$ 以上を越える症例が約 25%あり、副作用予防の観点から、VRCZ 血中濃度測定 of 臨床的意義が明らかとなった。さらに、薬物代謝酵素 CYP2C19 のサイクリングプローブを用いる遺伝子多型解析法を開発した。

研究成果の概要（英文）：A simple analytical method using column-switching has been developed for the determination of blood level of antifungal drugs, voriconazole (VRCZ) and micafungin. The method developed here has successfully applied for the patient samples, and results showed approximately 25% of the patients had a blood concentration trough value exceeding $4.5 \mu\text{g/mL}$, at which liver dysfunction may occur, suggesting that the measurement of blood VRCZ concentrations is clinically important for preventing side effects. And a convenient method using cycling probe technique has been developed for the analysis of a genetic polymorphism of drug metabolizing enzyme, CYP2C19.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,180,000	354,000	1,534,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,520,000	756,000	3,276,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：カラムスイッチング HPLC 法、テーラーメイド治療、抗真菌薬、サイクリングプローブ法、遺伝子変異、Poor Metabolizer、口腔粘膜細胞、毛髪

1. 研究開始当初の背景
 医療技術の進歩に伴う易感染患者の絶対

数増加が、以前では問題とならなかった新たな感染症発症原因となっている。その中でも

特に、深在性真菌症が発症する機会は、以前より急速に増加しており、その迅速で適切な治療が、患者の生命予後を左右している。深在性真菌症は、病原真菌 (*Candida* 属、*Aspergillus* 属、*Cryptococcus neoformans* など) が、血液を含む体内各臓器に感染して発症する感染症である。特に、超大量の抗がん剤投与が繰り返され、極度の免疫不全状態に陥る白血病、悪性リンパ腫などの血液疾患では、抗がん剤投与による免疫能低下に加え、造血幹細胞移植に伴う免疫抑制剤投与、抗生物質大量投与による菌交代現象、カテーテルに代表される侵襲性医療器具の使用などが原因となり、深在性真菌症の発症リスクを更に高めている。このような状況下で、適切な薬剤を選択し、速やかに深在性真菌症に対する治療効果をあげるためには、薬物の血中濃度測定を行いながら最小用量で最大効果の得られる投与量を決定することが望ましい。

しかしながら、腎機能や肝機能状態、薬物吸収能のばらつきによって血中濃度に差が生じ、十分な血中濃度に達していない患者のいることも指摘されている。また、最近の薬物動態学 (PK) /薬理学 (PD) に基づく投与方法の検討では、ピーク依存性なのかトラフ依存性なのか必ずしも解明されていない抗真菌薬もある。さらには同じ抗真菌薬であっても、病原真菌の種類によってピーク依存性あるいはトラフ依存性となるとの報告もある (医療薬学, 29, 449-456, 2003; *Ther. Drug Monit.*, 2, 635-636, 2000)。そのため、これら抗真菌薬の血中濃度を測定し、適正な投与量、投与計画を設定することが必要である。また、最近では、難治症例に対する抗真菌薬の併用例も増加しており、一斉分析法の開発が望ましい。本研究は、実検体における測定結果を背景に、迅速に一斉分析できる測定法を開発し、血液内科領域で望まれている抗真菌薬の投与量、投与方法について新たな提案をするものである。

2. 研究の目的

深在性真菌感染症に用いられるミカファンギン (MCFG) およびその水酸化活性代謝物、ボリコナゾール (VRCZ)、イトラコナゾール (ITCZ)、およびその水酸化活性代謝物について、オンラインで除タンパクを行い、分析する HPLC 法を開発する。また、CYP2C19 の遺伝子多型をインベーター法あるいは PCR 法で増幅後、シーケンサーで塩基配列を確認し、遺伝子変異を決定する。これまでに日本人において、CYP2C19 における PM 型は CYP2C19*2 および CYP2C19*3 と報告されているが、まだ

見出されていない新規 PM の一塩基多型 (SNPs) を発見する。さらに、開発した簡易一斉分析法を用いて血中濃度が高値となる症例を迅速に検出し、PM における新規 SNPs を見出す検査法とする。

3. 研究の方法

(1) 抗真菌薬の簡易迅速測定法の開発

前処理カラムとして MAYI-ODS を使い、カラムスイッチングによりバルブを切り替えることで除タンパク操作をオンライン上で行い、分析カラムにて薬剤を分離・定量する。このカラムスイッチング法は、トラップさせた薬物を溶出する際に、移動相溶液を逆流させるバックフラッシュモードを用いることで再現性よく定量できる。この方法はオンライン上で除タンパク、分離および定量が行え、従来から用いられている HPLC 法を基盤とした条件を工夫することで測定法を確立できる。VRCZ および MCFG を用いた定量法を確立し、薬物血中濃度測定に応用する。

(2) 実サンプルにおける血中濃度測定

PK/PD 理論に基づいた投与計画を立てるための、血中濃度測定を行う。さらに、この血液を使って得られた CYP2C19 遺伝子解析の結果を用いて血中濃度との関連性を比較検討する。抗真菌薬の簡易測定と薬物代謝酵素 (CYPs) の代謝異常との関連を考察し、テーラーメイド治療へ向けた抗真菌薬の投与方法を提案する。VRCZ および MCFG 定量については開発したカラムスイッチング HPLC 法を用いて測定し、ITCZ については既報 (*Biomed. Chromatogr.* 20:343-348, 2006) に従って行った。

(3) CYP2C19 遺伝子解析

患者の血液よりジルコニアビーズを添加しボルテックスにて細胞を破碎後、固相抽出を用いた DNA 抽出キット (QIAamp DNA mini kit) を用いて DNA を抽出する。CYP2C19 の領域 (*Drug Metab. Pharmacokinet.*, 20, 300-307, 2005) を含むプライマーおよびサイクリングプローブを GenBank よりゲノムシーケンスを用いて変異部位である CYP2C19*2 および CYP2C19*3 設計し、PCR 増幅装置を用いて PCR を行う。

4. 研究成果

(1) 抗真菌薬の簡易迅速測定法の開発

前処理カラムに内面逆相系の Shim-pack MAYI-ODS を使い、測定後 0.5 分で前処理カラムから血漿中のタンパクが約 97% 排出され、目的薬物がトラップされた。バルブを切り替えてバックフラッシュモードにすると、1 分で目的薬物が前処理カラムから溶出され、分析カラムでの分離を可能とした。さらに分析

カラムで分離中、移動相に酢酸アンモニウムを用いることで、前処理カラム内をオンラインで十分に洗浄することができた。

VRCZのカラムスイッチングHPLC定量法では、相関係数0.998以上と良好な直線性を示し、定量範囲は血漿中濃度として $0.2 \cdot \cdot \text{g/mL} \sim 10 \cdot \text{g/mL}$ であった。また、定量精度も良好であった。患者検体に応用し、従来法と比較したところ、 $R^2=0.9725$ ($n=17$)と良好な相関性を得ることができ (Fig. 1)、VRCZのカラムスイッチング法を用いる簡易迅速測定法を開発した。

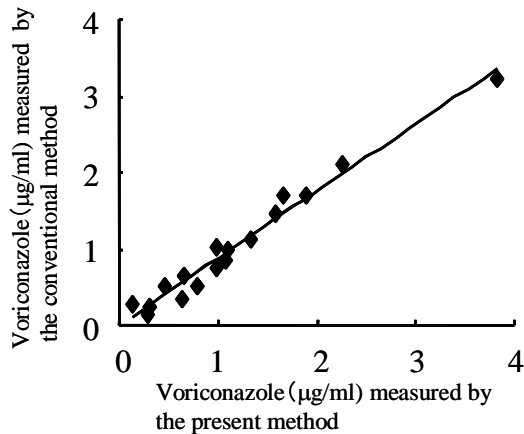


Fig 1. 開発したカラムスイッチング法と従来法の比較 (VRCZ)

同様にMFCGもカラムスイッチングHPLC測定法を開発し、内標準法で検量線を作成すると、相関係数0.99以上という良好な直線性が得られ、定量範囲は血漿中濃度として $0.1 \cdot \cdot \text{g/mL} \sim 10 \cdot \text{g/mL}$ であった。また、定量精度も良好であった。患者検体に応用し、従来法と比較したところ、 $y = 0.9954x + 0.0196$, $R^2=0.9955$ ($n=16$)と良好な相関性を得ることができ (Fig. 2)、MFCGのカラムスイッチング法を用いる簡易迅速測定法を開発した。

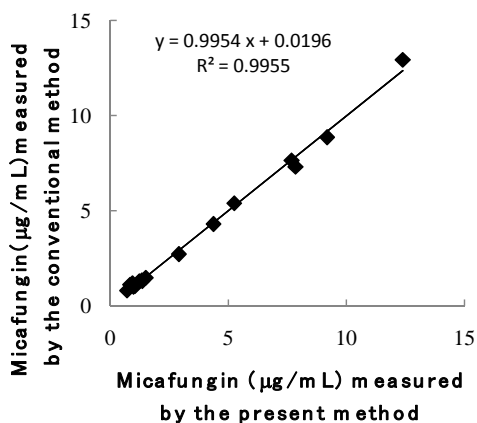


Fig 2. 開発したカラムスイッチング法と従来法の比較 (MFCG)

(2) 実サンプルにおける血中濃度測定

①VRCZ 血中濃度測定

VRCZは15例が1日2回、生理食塩液100 mLに溶解し、1時間かけて点滴静注された。また37例が1日2回食後2時間に経口投与された。ローディングドーズを含めた1日投与量は 376.5 ± 65.1 (mg/日)、血中濃度は 3.27 ± 2.33 ($\cdot \text{g/mL}$)、C/D値 (VRCZ血中濃度/VRCZ1日投与量)は 0.0086 ± 0.0058 であった。52症例のうち、体重の測定が不可能であった1症例を除く51症例で、添付文書に準じた1日投与量以下の設定を行っていたものは42症例 (低用量両群)、重症度が高く主治医の判断で添付文書の記載より高用量で投与されたものは9例であった (高用量群)。このうち、VRCZの血中濃度が $4.5 \cdot \text{g/mL}$ を越えていたものは、低用量群で42例中11例、高用量群で9例中2例であった。C/D値は、男性で 0.0101 ± 0.0058 、女性で

0.0041 ± 0.0020 であり、両群間に有意差が認められた (t検定: $P=0.001$)。血中濃度測定の結果より、CCr値 (Cockcroft-Gaultの簡易計算法より算出)が上昇しても、VRCZの血中濃度に変動を及ぼす可能性は低く、腎機能に軽度障害のある患者に対して減量を行わなくても、比較的安全に投与できる薬剤であることが明らかとなった。しかし、今回の結果では、有意差は認められないものの、腎機能が低下すると血中濃度が上昇する傾向にあることから、中等度以上の腎機能低下患者に対しVRCZを投与する場合、通常より血中濃度測定回数を増やすことで投与量を調整するなど、慎重な対応も必要であると考えられる。VRCZの添付文書には、本剤の投与期間中は血中濃度をモニタリングすることが望ましいとの記載はあるが、実際に規定通りの投与設定を行っても、どの程度の頻度で肝機能障害の発生が問題とされる血中濃度トラフ値、 $4.5 \mu\text{g/mL}$ 以上を越える症例が出現するのかが明らかとされていなかった。今回はじめて、VRCZ血漿中濃度を測定した結果、トラフ値が $4.5 \mu\text{g/mL}$ 以上となった症例が約25%を占めたことから、臨床での副作用回避にVRCZ血漿中濃度モニタリングが重要であることが明示された。

また、注目すべき結果として、VRCZのC/D値が男性では高く、女性では低くなるのは、CYP2C19の活性に性差のあることが一因であると考えられた。

②MFCG 血中濃度測定

肺Aspergillus症臨床診断例7例、真菌感染疑い例9例、予防投与例20例の計36名を対象に、MFCGの臨床的有用性と血中濃度との

関連を解析した。臨床症状の改善度は、臨床診断例7例中では著明改善3例、改善4例、感染疑い例9例中では著明改善2例、改善7例、予防投与例20例中では全例が予防に成功した。臨床診断別のMCFGトラフ血中濃度は、肺Aspergillus症臨床診断例 4.24 ± 2.80 ・g/mL、真菌感染疑い例 4.41 ± 2.55 ・g/mL、真菌感染予防例 3.45 ± 1.63 ・g/mLであり、3群間に有意な差は認められなかった。また、同様に、臨床症状改善度別のMCFGトラフ血中濃度は、著明改善例 5.23 ± 2.44 ・g/mL、改善例 4.08 ± 2.63 ・g/mL、予防成功例 3.45 ± 1.63 ・g/mLであり、3群間に有意な差は認められなかった。以上より、肺Aspergillus症に対してMCFGを投与する場合、トラフ血中濃度は4・g/mL程度を目標に投与量設定を行うことが望ましいと考えられた。更に、著明改善例がトラフ血中濃度 5.23 ± 2.44 ・g/mLであったことを考慮すると、重症例ではトラフ血中濃度を5・g/mL以上とする積極的投与量設定が必要になるものと考えられた。

③ITCZ血中濃度測定

対象患者26例の性別は、男性18例、女性8例、年齢は 59.3 ± 12.3 （歳）、体重は 56.4 ± 9.2 （kg）であった。原疾患は急性骨髄性白血病（AML）12例、慢性骨髄単球性白血病（CMML）1例、急性リンパ性白血病（ALL）1例、骨髄異形成症候群（MDS）1例、多発性骨髄腫（MM）1例、形質細胞性白血病（PCL）1例、ホジキンリンパ腫（HL）1例非ホジキンリンパ腫（NHL）7例、再生不良性貧血（AA）1例であった。ITCZ-OSは26例全例が1日1回朝食前に200mgを経口投与した。なお、いずれの患者も他のITCZ製剤（カプセル製剤、注射製剤）の先行投与は行われていなかった。

ITCZ-OS未変化体血中濃度は 2396.5 ± 1742.7 ng/mL、ITCZ-OSヒドロキシ体血中濃度は 5384.4 ± 3348.2 ng/mLであった。ITCZ-OSは26例全例が一律に1日1回朝食前に200mgを投与していたことから、体重の測定が不可能であった男性4症例を除く22症例で体重あたりの投与量と血中濃度との関係を解析した。その結果、体重あたりの投与量と体重あたりのITCZ-OS未変化体血中濃度では $R^2=0.134$, $P=0.094$, 体重あたりの投与量と体重あたりのITCZ-OSヒドロキシ体血中濃度では $R^2=0.154$, $P=0.071$ となり、体重あたりの投与量と体重あたりのITCZ-OS未変化体並びに体重あたりのITCZ-OSヒドロキシ体血中濃度との間に相関は認められなかった。男女別体重あたりのITCZ-OS未変化体血中濃度は男性で 29.7 ± 23.4 ng/mL、女性で 65.8 ± 51.4 ng/mL（t検定： $P=0.025$ ）、体重あたりのITCZ-OSヒドロキシ体血中濃度は男性で 66.7 ± 44.8 ng/mL、女性で

148.1 ± 98.2 ng/mL（t検定： $P=0.010$ ）であった。そこで男女別に、体重あたりの投与量と血中濃度との関係を再解析した。その結果、体重あたりの投与量と体重あたりのITCZ未変化体血中濃度は男性で $R^2=0.056$, $P=0.417$ 、女性で $R^2=0.000$, $P=0.973$ 、体重あたりの投与量と体重あたりのITCZ-OSヒドロキシ体血中濃度は男性で $R^2=0.059$, $P=0.403$ 、女性で $R^2=0.002$, $P=0.923$ となり、男女別でも体重あたりの投与量と体重あたりのITCZ-OS未変化体並びに体重あたりのITCZ-OSヒドロキシ体血中濃度との間に相関は認められなかった。

血中濃度測定の結果より、ITCZ-OS未変化体並びにITCZ-OSヒドロキシ体の血中濃度は患者間でばらつきが大きく、その血中濃度は体重あたりの投与量に換算しても相関は認められなかった。またITCZ-OS未変化体血中濃度並びにITCZ-OSヒドロキシ体血中濃度との間には相関が認められたことから、今回測定対象の患者では、肝臓及び小腸でITCZ-OS未変化体が酸化されITCZ-OSヒドロキシ体に代謝される過程で飽和は生じなかったものと考えられる。ヒドロキシ体は主活性代謝物であることが知られているが、その抗真菌活性は未変化体ITCZと同等もしくは2倍から3倍との報告がある。既に述べたように、ITCZ血中濃度がトラフ値で250 ng/mLから500 ng/mLの範囲内であれば、真菌感染が疑われる発熱性好中球減少症に対して有効性が期待できるとされている。本症例において、ITCZ-OS未変化体血中濃度のトラフ値は 2396.5 ± 1742.7 ng/mL、ITCZ-OSヒドロキシ体血中濃度のトラフ値は 5384.4 ± 3348.2 ng/mLであった。従って、今回測定対象の患者では、ITCZ-OS未変化体血中濃度並びにITCZ-OSヒドロキシ体血中濃度が高濃度で維持されていたことから、真菌感染が疑われる発熱性好中球減少症に対して十分な有効性が期待できる血中濃度が確保されていたことが明らかとなった。

これまでに我々は、血中濃度を指標とした血液内科領域における抗真菌剤の適正な投与量設定を行う目的で、キャンディン系抗真菌剤MCFGやトリアゾール系抗真菌剤VRCZの血中濃度測定を行った。その結果、肺アスペルギルス症を対象にMCFGを投与する場合、トラフ血中濃度は4・g/mL程度、より重症例ではトラフ血中濃度を5・g/mL以上とする積極的投与量の設定が必要で、実際のMCFG投与量は、150mg以下でも十分な症例があることを明らかにした。更に、VRCZでは肝機能障害の発生が危惧される血中濃度のトラフ値 4.5 ・g/mL以上を越える症例が約25%あり、副作用予防の観点から、VRCZ血中濃度測定の臨床的意義を明らかにすると同時に、VRCZは血中濃度に性差のあることを報告し

た。そこで、ITCZ-OS についても同様に性差が存在している可能を考え、体重あたりの血中濃度を男女別に比較した。その結果、男女別体重あたりの ITCZ-OS 未変化体血中濃度、ITCZ-OS ヒドロキシ体血中濃度のいずれもが女性で有意に高値を示すことが明らかとなった。そこで、男女別で体重あたりの投与量と ITCZ-OS 未変化体並びに ITCZ-OS ヒドロキシ体血中濃度との間の相関を再解析したが、相関は認められなかった。

治療薬が少ない深在性真菌症領域において、優れた抗真菌スペクトルと高い消化管吸収力を有する ITCZ-OS が登場したことは、临床上重要な意義を有する。従って今後は、更なる症例数を重ね、有効かつ安全に ITCZ-OS が投与できるよう、血中濃度測定を実施し速やかに適切な投与量が設定できる体制が必要であると考えらる。

(3) CYP2C19 遺伝子解析

設計したサイクリングプローブおよびプライマーを用いて CYP2C19*2 および CYP2C19*3 の SNP 部位を測定したところ、ボランティアの口腔粘膜細胞、毛髪および末梢血はすべて同一の結果が得られた。8名のボランティアのうち、2名がPMであり、*2/*2型および*2/*3型であった。他の6名はEMであり、2名が*1/*1型、1名が*1/*2型、3名が*1/*3型であった。なお、既存の Taq Man Probe 法を用いても同様の結果を得た。末梢血の採取は患者の苦痛を伴うが、口腔粘膜細胞および毛髪を用いることで非侵襲的に試料を採取でき、サイクリングプローブを用いる SNPs 解析法を開発した。

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2件)

1. Nakagawa S, Suzuki R, Yamazaki R, Kusuhashi Y, Mitsumoto S, Kobayashi H, Shimoeda S, Ohta S, Yamato S: Determination of the antifungal agent voriconazole in human plasma using a simple column-switching high-performance liquid chromatography and its application to a pharmacokinetic study. Chem Pharm Bull. 56:328-331, 2008. 査読有
2. 下枝貞彦、中澤一純、小林光、中川沙織、大和進、笹木睦子、河野健治、太田伸: 血液内科領域におけるポリコナゾール血中濃度測定の臨床的意義. 医療薬学 34, 638-643, 2008. 査読有

[学会発表] (計2件)

1. 桑原直子、中川沙織、下枝貞彦、太田伸、

大和進: サイクリングプローブ法を用いる薬物代謝酵素 CYP2C19 の非侵襲的な塩基多型測定法. 日本薬学会第130年会(岡山)、2010年3月28日

2. 桑原直子、中川沙織、小林光、下枝貞彦、太田伸、大和進: カラムスイッチング法を用いる血漿中ミカファンギンの簡便な定量法の開発. 第52回日本薬学会関東支部大会(埼玉)、2009年10月3日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下枝 貞彦 (SHIMOEDA SADAHIKO)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 40515087

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

大和 進 (YAMATO SUSUMU)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 60057370

中川 沙織 (NAKAGAWA SAORI)

新潟薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 30410228