

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16005

研究課題名（和文）生体局所での薬物相互作用を定量する革新的薬物センサシステムの創出

研究課題名（英文）Development of in vivo simultaneous drug monitoring system

研究代表者

澤村 晴志朗（Seishiro, Sawamura）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：10781974

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）：難治性てんかんの治療には複数の抗てんかん薬が投与されるが、従来の方法では、薬物動態や細胞機能の定量的な評価が難しくその併用効果に関する知見は少ない。本研究では、我々が開発した、「針状ダイヤモンドセンサ」を使用した薬物モニタリングシステムを用いて、複数の抗てんかん薬を、in vivoで高感度かつ同時リアルタイムに定量する計測法を創出した。この手法は、多剤併用における薬物間相互作用を定量的に理解することに貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかん症例の約3割は単一薬治療に抵抗性の難治性てんかんだとされる。これに対して多剤併用治療が標準的に実施されるが、効果的な組み合わせの予測は難しく、治療効果が少ないことや副作用の発現に苦しむ患者も多い。本研究で創出した、抗てんかん薬の新規計測法は、in vivoリアルタイムでの感度および分解能の高い薬物濃度計測を可能にする。これによって得られる知見は、従来法では難しい、複数薬の相互作用の定量的理解を進めることに貢献する。

研究成果の概要（英文）：For the treatment of refractory epilepsy, multiple antiepileptic drugs would be administered. However, by conventional analytical methods, it is difficult to quantitatively evaluate pharmacokinetics and cellular functions. Therefore, limited knowledge regarding the combined effects of these drugs is available. In this study, we developed a drug monitoring system using a "needle-like diamond sensor" and created a measurement method to quantitatively and simultaneously monitor multiple antiepileptic drugs in vivo with high sensitivity and real-time capability. This technique is expected to contribute to the quantitative understanding of drug-drug interactions in polytherapy.

研究分野：薬理学

キーワード：抗てんかん薬 電気化学 生体計測

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬物の標的細胞集団の機能を調節することによって薬効を発揮する。多剤併用は、複数薬物を同時に使用することで、薬効の増強や副作用の低減、薬剤耐性への有効性を目指す方法であるが、薬物間の相互作用の理解が不足しており、理論的な投薬設計が困難であることが課題となっている。抗てんかん薬の治療においても多剤併用が一般的であり、特に難治性てんかんの治療には異なる作用メカニズムを持つ抗てんかん薬の組み合わせが使用されるが、その併用効果については十分な知見が得られていない(French et al, *Epilepsia*, 2009)。従来の方法では、薬物動態や細胞機能の定量的な評価が難しく、薬物モニターシステムの開発が待ち望まれている。最近、我々は先端径 $40\ \mu\text{m}$ の「針状ダイヤモンドセンサ」を使用した新たな薬物モニターシステムを開発した(図 1, 2/ Ogata et al, *Nat Biomed Eng*, 2017)。この手法によって生物の脳内で薬物濃度と薬効をリアルタイムで計測することが可能となった。しかし、現状では単一薬物の測定に限定されており、複数薬物の同時評価には技術的な問題がある。

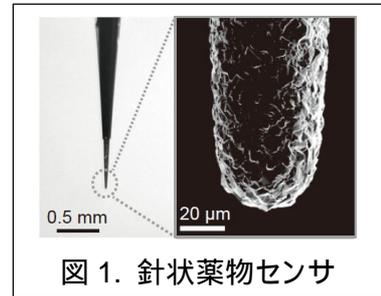


図 1. 針状薬物センサ

2. 研究の目的

多剤併用の薬物相互作用には、薬物動態における相互作用と薬効における相互作用がある。このうち、薬物動態における相互作用は、いくつかの薬剤併用で起こった臨床事故からこの 20 年で強く認識され、評価法が確立されてきた。一方で、複数薬物が標的に同時に作用した際の干渉作用である薬力学的相互作用は、その局所における薬物濃度に加えて薬効指標となる細胞機能を併せてモニターする必要があるが、定量的な評価系はほとんどない。本研究では、先述の計測システムを複数薬物へと適用できるように技術拡張し、標的局所で抗てんかん薬の併用効果を定量的に評価できる計測系を開発する。

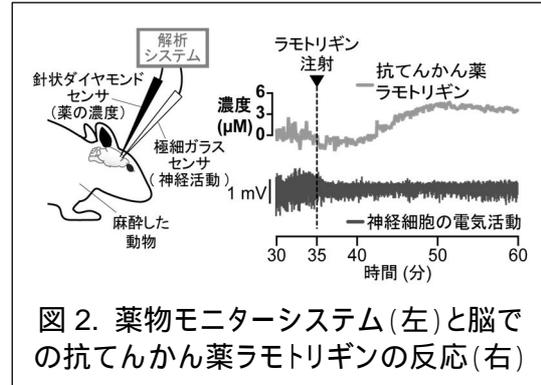


図 2. 薬物モニターシステム(左)と脳での抗てんかん薬ラモトリギンの反応(右)

3. 研究の方法

(1) 針状ダイヤモンドセンサの微細化

先端径を $10\sim 20\ \mu\text{m}$ に電解研磨したタングステン針を特注し、ホウ素を加えたプラズマ μCVD によってホウ素ドーパダイヤモンドコーティングした。コーティングされた針状電極を顕微鏡下でガラス管に入れ、石英ガラスチャンバー内で熱を加えてシーリングすることで、露出する電極面積を規定した。

(2) 抗てんかん薬の電気化学測定

PBS 溶液中にホウ素ドーパダイヤモンド電極(作用極)、プラチナ電極(対極)、銀塩化銀電極(参照極)を浸し、電位を -1V から $+1.5\text{V}$ の範囲でスキャンして電気化学応答をポテンショスタットを用いて計測した。適切な溶媒に抗てんかん薬を溶かしたストック溶液を 1000 倍希釈となるように加えることで起こる応答の変化を、抗てんかん薬の電気化学反応として解析した。定量のため、複数の濃度の抗てんかん薬を加えた際の電流変化をプロットして検量線を作成した。3SD を超える電流値が見られる濃度を検出下限濃度とした。検出感度に優れたベンゾジアゼピン系抗てんかん薬については、感度や時間分解能に優れる square-wave voltammetry 法の一つ、Osteryoung square-wave voltammetry 法を用いた計測を実施し、未変化体および代謝物の電位応答の違いを詳細に明らかにした。

リアルタイム測定においては、PBS 溶液に針状電極を浸し、5 秒に 1 度のスキャンを行いながら、抗てんかん薬および代謝物のストック溶液を徐々に加え、測定溶液中の濃度を変化させ、電流応答の変化を追跡した。

ラット脳における *in vivo* 測定では、麻酔下で頭蓋を開き、硬膜に 33G 針で穴をあけて針状電極を刺入した。対極および参照極は細いプラチナおよび銀塩化銀線をガラス管に格納したものを、背部皮下に留置した。抗てんかん薬は、頸静脈に留置したカテーテルを介して静脈注射した。脂溶性の高い抗てんかん薬は、5%DMSO, 5% Cremophor を含む生理食塩水に溶かして注射液とした。測定においては、まず vehicle 溶液を注射し、30 分経過後に標的薬を含む溶液を投与して、電流変化をリアルタイムにモニターした。

4. 研究成果

(1) 抗てんかん薬の電気化学的測定法の確立

既存の抗てんかん薬について、電気化学的に測定できるか、酸化還元反応が起こる電位はいくらかを *in vitro* の溶液系でスクリーニングした。計 20 種の抗てんかん薬やその代謝物について測定した結果、約3分の2について電気化学応答が確認でき、反応電位と検出感度を決定できた。特に、ベンゾジアゼピン系抗てんかん薬はサブ μM という低濃度から測定できた。

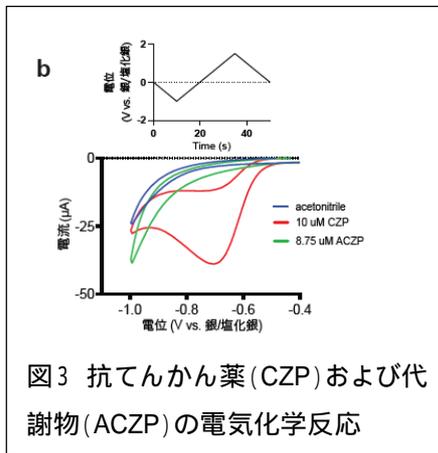


図3 抗てんかん薬 (CZP) および代謝物 (ACZP) の電気化学反応

(2) 抗てんかん薬および代謝物をリアルタイムに測り分ける測定法の確立

感度良く測定できた2種のベンゾジアゼピン系抗てんかん薬に着目して進めた。全身に投与されたベンゾジアゼピン系抗てんかん薬は、体内の代謝酵素によって複数の代謝物が生成される。そのうち、主要代謝物は、脳内において未変化体と同程度の存在比を示した例もある。一般に、これら抗てんかん薬は代謝されると活性のほとんどを失うため、濃度動態と薬効の関係性を知るためには、活性の主成分である未変化体と代謝物を測り分ける必要がある。しかしながら、分子構造自体はほとんど変わらないため化学分析による識別は難しい。計画した通り、広い電位幅をスキャンする電気化学測定で未変化体と主要代謝物の反応性を比較し、還元電位における両者の反応性の違いを見出した(図3)。それぞれの電気化学反応電位の違いに基づき、代謝物との測り分けが可能なりアルタイム測定プロトコルを構築した。この方法では、臨床で求められるモニタリング濃度範囲の未変化体を代謝物と切り分けて十分な精度・感度で同時測定できた。

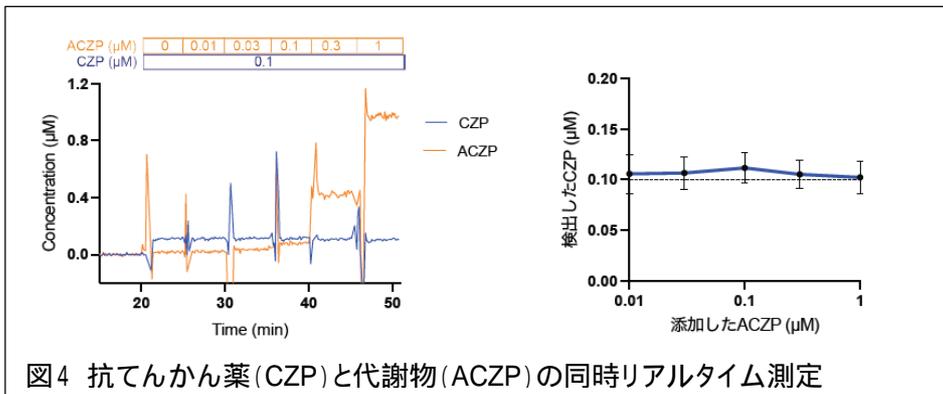


図4 抗てんかん薬 (CZP) と代謝物 (ACZP) の同時リアルタイム測定

(3) ラット脳での抗てんかん薬の *in vivo* 測定

上記測定法を用いて、ラット大脳皮質に針状ダイヤモンドセンサを刺入し、静脈に留置したカテーテルから投与した抗てんかん薬の *in vivo* リアルタイム濃度計測を実施した。*in vivo* 計測において、生体由来のノイズや電流値のドリフトが問題となる。これを避けるために、internal control となる電位をセットして、目的薬物の電気化学反応を標準化する方法を構築した。これによって、*in vivo* 脳内計測でも、安定した定量値を得ることができた。その結果、投与後約3分でピーク濃度に達し、その後緩やかに減少するという、抗てんかん薬としての活性を持つ未変化体薬物の脳内動態を測定できた。

以上より、複数薬物を *in vivo* でリアルタイムに測り分ける計測システムの基盤を開発した。今後、薬効指標を同時に測定し、薬物間の相互作用を定量できる系へと発展させる。

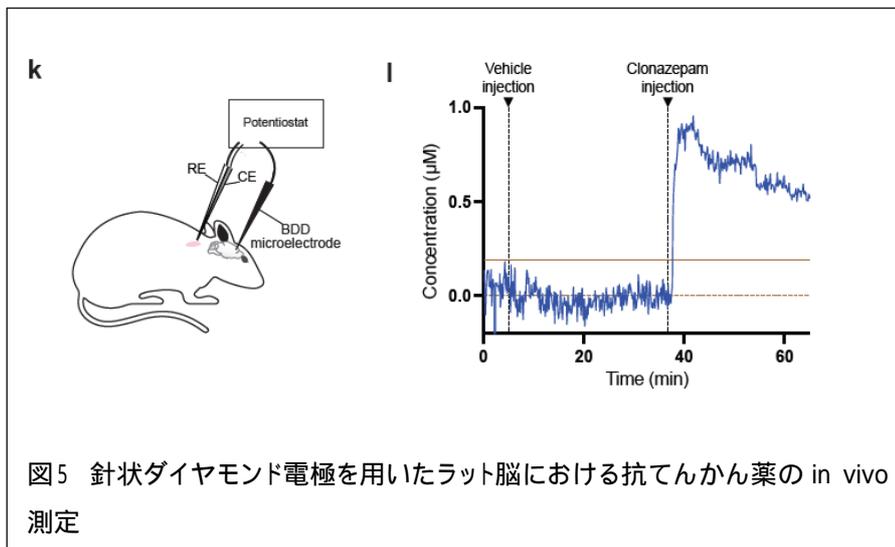


図5 針状ダイヤモンド電極を用いたラット脳における抗てんかん薬の *in vivo* 測定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Sawamura Seishiro, Ogata Genki, Asai Kai, Razvina Olga, Ota Takeru, Zhang Qi, Madhurantakam Sasya, Akiyama Koei, Ino Daisuke, Kanzaki Sho, Saiki Takuro, Matsumoto Yoshifumi, Moriyama Masato, Saijo Yasuo, Horii Arata, Einaga Yasuaki, Hibino Hiroshi | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Analysis of Pharmacokinetics in the Cochlea of the Inner Ear | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology | 6. 最初と最後の頁 1-11 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2021.633505 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Ota Takeru, Nin Fumiaki, Choi Samuel, Muramatsu Shogo, Sawamura Seishiro, Ogata Genki, Sato Mitsuo P., Doi Katsumi, Doi Kentaro, Tsuji Tetsuro, Kawano Satoyuki, Reichenbach Tobias, Hibino Hiroshi | 4. 巻 472 |
| 2. 論文標題 Characterisation of the static offset in the travelling wave in the cochlear basal turn | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology | 6. 最初と最後の頁 625 ~ 635 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00424-020-02373-6 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Hanawa Ai, Ogata Genki, Sawamura Seishiro, Asai Kai, Kanzaki Sho, Hibino Hiroshi, Einaga Yasuaki | 4. 巻 92 |
| 2. 論文標題 In Vivo Real-Time Simultaneous Examination of Drug Kinetics at Two Separate Locations Using Boron-Doped Diamond Microelectrodes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Analytical Chemistry | 6. 最初と最後の頁 13742 ~ 13749 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.0c01707 | 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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Seishiro Sawamura, Ogata Genki, Koei Akiyama, Einaga Yasuaki, Hiroshi Hibino. |
| 2. 発表標題 A micro sensing system for in vivo real-time monitoring of drug kinetics in brain. |
| 3. 学会等名 The 11th NIPS-PRI-BRINU Joint Symposium |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 澤村 晴志朗, Norzahirah Binti Ahmad, 緒方 元気, 秋山 洸英, 石井 あゆみ, 栄長 泰明, 日比野 浩 |
| 2. 発表標題 ダイヤモンド電極を用いた皮膚刺入型薬物センサの開発 |
| 3. 学会等名 細胞の局所コミュニティ研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 澤村 晴志朗, 緒方 元気, 桑原 沙耶香, 加藤 理都, 浅井 開, ラズピナ オリガ, 栄長 泰明, 日比野 浩 |
| 2. 発表標題 針状ダイヤモンド電極を用いた複数薬物のリアルタイム定量法 |
| 3. 学会等名 第59回日本生体医工学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|