

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 27日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590137

研究課題名（和文） マイクロドーズ手法のTDMへの応用

研究課題名（英文） Application of microdosing technique for therapeutic drug monitoring

研究代表者

平野 和行 (HIRONO KAZUYUKI)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90057365

研究成果の概要（和文）：近年、新薬開発のPhase 0と位置づけられるマイクロドーズ(MD)臨床試験が脚光を浴びている。申請者は、H-D交換反応を用いた新規重水素導入法を用い新たに重水素標識標準物質を合成した。MD手法に適した質量分析(MS)装置を用いた超高感度分析系(LC-MS/MS、LCMS-IT-TOF、およびMALDI-TOF/TOF)を確立し、MD手法が薬物血中濃度モニタリング(TDM)に有用である可能性を示した。MDによる患者の薬物動態パラメータの決定手法が臨床でのTDMに応用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The phase 0 microdose (MD) study appears as a new viable concept in the clinical research of the drug development activity. We synthesized clobazam- d_2 as the internal standard using a H-D exchange reaction. We developed several analytical methods (LC-MS/MS, LCMS-IT-TOF, MALDI-TOF/TOF) using clobazam- d_2 for the MD study. MD technique may be applied to pharmacokinetic parameter prediction in the therapeutic drug monitoring.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学

キーワード：マイクロドーズ、薬物血中濃度モニタリング、LC-MS/MS、MALDI-TOF/TOF、重水素化内部標準物質

1. 研究開始当初の背景

(1) 薬物治療モニタリング(TDM)は、薬物治療の適正化に貢献をしている。しかし、母

集団パラメータあるいは遺伝子多型等を用いた従来のTDMでは、初期投与方法決定時に患者個人の正確な血中濃度プロファイルあ

るいは代謝プロファイルを予測することは不可能であり、原理的にその予測精度の大幅な向上は困難である。

近年、無作用量(薬効発現量の 1/100 を超えない用量又は 100 μ g のいずれか少ない用量)をヒトに投与するマイクロドーズ(MD)臨床試験が脚光を浴びている。申請者は、MD 手法を TDM に応用した新たなテーラーメイド医療を意図した。

(2) MD 試験は新薬開発の効率を高める手法として、日米欧で注目され導入が積極的に推進されている(厚生労働省;マイクロドーズ臨床試験の実施に関するガイダンス(薬食審査発第 0603001 号、2008)、EMA; Evaluation of medicines for Human Use、CPMP/SWP/2599/02/, 23, 2003、FDA; IND Studies (DRAFT GUIDANCE)、April 2005)。前臨床で行われる MD 試験では、薬物微量投与後、超高感度分析法を用い得られる特定物質の薬物動態、分布特性、受容体選択プロファイル等がヒトのデータとして使用できる点で大きな意義がある。

(3) MD 試験には二つの問題がある。一つは、高感度分析装置の問題である。現在多くの MD 試験に利用されている加速器質量分析計(AMS)では、その血中濃度測定に放射性同位体元素(RI)でラベル化した hot の化合物が必要であり、日本では hot の化合物を用いた臨床試験を実行することは倫理的に容易ではない。さらに、bioanalysis に使用される AMS は世界に数施設であり、日常的に利用することはできない。この問題解決には、分離分析手段として RI 標識化合物を用いない質量分析装置(高速液体クロマトグラフ質量分析装置(LC-MS)、マトリックス支援レーザー脱離(MALDI-TOF/TOF))を MD 試験に取り入れることが有効であると考えられた。もう一つの問題は、”MD 試験が臨床で意味を持つためには、MD と臨床用量の範囲で体内動態の線形性が保たれなければならないがその保障が無い”という点である。これに対して日本薬物動態学会の薬物動態試験推進委員会(委員長大野泰雄)の答申では、「Km 値に比べて十分に低いところでは線形性が保たれることは当然であり、それを否定する根拠はない」と述べられている。しかし、この指摘に関しては今後の臨床研究によるエビデンスに基づいて回答される必要がある。

(4) 我々は、既に LC-MS/MS を用いて種々の薬剤に対して MD 試験に対応可能な超高感度測定系を開発している(β 刺激薬リトリン: 定量限界 80 fg on column、抗てんかん薬カルバマゼピン: 3 pg on column)。また、代謝プロファイル決定のための迅速測定の

方策として、低極性から高極性(代謝物)の化合物を同定・定量するために新規開発の高極性対応カラムの有用性を明らかにし、25 種類のベンゾジアゼピン系薬物および主代謝物の同時定量法を確立している(M. Nakamura, *Biomedical Chromatography*, 23, 357-364 (2009))。これらの超高感度測定に関するノウハウを活用し、MD 手法を TDM に活用したテーラーメイド医療実現を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MD 手法を TDM に応用した新たなテーラーメイド医療を実現することである。この目的を達成するために、第一に MS の内部標準物質に最適な重水素を導入した安定同位体標準物質を合成する。第二に、得られた内部標準物質を活用して、LC-MS/MS、LCMS-IT-TOF、MALDI-TOF/TOF による MD 対応超高感度分析法を開発する。最後に、本分析法を用いた MD 手法を TDM に応用する。MD 手法が患者個々の薬物療法の適正化(薬剤選択、投与方法決定)の強力なツールとなり、テーラーメイド医療の質の向上を目指す。

3. 研究の方法

MD 手法に適する超高感度 MS 分析手法の開発のために下記の検討を行った。

(1) LC-MS分析精度向上のための内部標準物質への新規重水素導入法の確立

LC-MS(/MS)、MALDI-TOF/TOF の分析精度向上のために、白金族不均一系触媒存在下、水素ガスを活性化剤および重水(D₂O)を溶媒兼重水素源とした H-D 交換反応を利用して、ベンゾジアゼピン系薬物(clobazam)へ重水素を導入した。

(2) ハイスループット LC-MS 分析系の開発

MD 分析における LC-MS 分析では、主化合物のみならず代謝物等の高極性薬物の良好な分離が求められる。従来のコンベンショナルな ODS C₁₈ カラムを用いる LC-MS/MS 分析では、生体成分由来の妨害物質と高極性化合物の分離が不十分であり、イオン化抑制によるイオン化効率の低下の可能性が考えられた。この問題を解決するため、高極性化合物(代謝物等)の保持を改善した高極性対応 ODS カラムを用いた。さらに、TDM での臨床応用には分析のハイスループット化が望まれる。そこで、高極性化合物に対応する小型 ODS カラム(粒子径 3 μ m, 10 \times 2 mm, Intakt 製)を用いた LC-MS 分析系を検討した。

(3) MALDI-TOF/TOF による MS 分析系の開発

MALDI-TOF/MS は、複雑な前処理を必要しないことから、ハイスループット分析が可能である。メタボノミクス手法を用いた代謝プロ

ファイルの検討に、MALDI-TOF/TOF (UltraFlex, Bruker 社) を用いた。MALDI-TOF/TOF でサンプルターゲットプレートの低分子薬物の定量性の確保には、優れた標準物質が必須であるため、上記(1)で合成した重水素導入した安定同位体を標準物質として用いた。肝ミクロソームを用い clobazam および主代謝物 *N*-desmethyloclobazam の代謝プロファイルを求めた。

(4) MS 分析を目的とした試料直接注入分析カラムの検討

分析の高速化と定量感度向上のためには、血液試料前処理での工夫が求められる。そこで、キャンディン系抗真菌薬ミカファンギンを対象として、新規疎水性/親水性ハイブリッド ODS 固定相が充填された血漿直接注入対応 HPLC 用カラムの検討を行った。

4. 研究成果

(1) LC-MS/MS 分析精度向上のための内部標準物質への新規重水素導入法の確立

安定同位体で標識した内部標準物質を使用することで、少量の血液で、感度に優れ、再現性のよい測定が可能である。今回新たに開発したクロバザムへの重水素の導入は、白金族不均一系触媒存在下、水素ガスを活性化剤、重水(D₂O)を溶媒兼重水素源とした H-D 交換反応を利用したものである。重水は天然水に約 150 ppm 含まれており、最も安価な重水素源である。我々の方法では、触媒の種類や混合比を代えることで位置選択的な重水素標識をすることができた。すなわち、clobazam へ 2 個の重水素の導入した標準物質 (clobazam-*d*₂) の生成に成功した。一方で、反応条件次第で重水素の導入が部分的なものとなる可能性がある。この点については反応温度を含めた条件を詳細に検討し、標準物質として最も適した標識体を合成した。また、同様の方法で他の医薬品あるいは生物活性物質の標識も可能であるが、基質ごとに反応条件を最適化することで、必要に応じた標識体を得ることができるものと考えている。

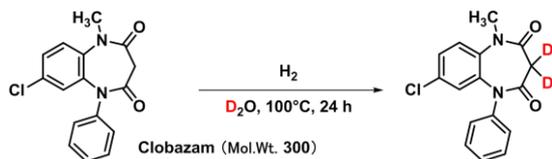


図 1 Deuterium labeling of clobazam

(2) ハイスループット LC-MS 分析系の開発

MS は、大量の定性情報が得られる上に選択性に優れていることから、微量成分の分析が

可能である。分析装置として、代謝分析に汎用される LC-MS/MS、および高い質量精度を有する LCMS-IT-TOF を検討した。イオントラップ質量分析計 (ion trap mass spectrometer、ITMS) はアイソレーションとフラグメンテーションを複数行う多段の MS/MS (MSⁿ) 分析が可能であるという特徴を有している。一方、TOF/MS は、高質量分解能と高質量精度の特徴を有しており、マススペクトルの収集も高速である。LCMS-IT-TOF は、これら ITMS 及び TOF/MS の 2 つの質量分析計を組み合わせたハイブリッド型の質量分析計として開発された。今回、LCMS-IT-TOF を用いた定量法を開発した。分析には高極性化合物に対応する小型 ODS カラムと重水素標識標準物質 Clobazam-*d*₂ を用いることで、clobazam およびその高極性代謝物を高感度、省溶媒かつハイスループットに定量できた。

表 1 Validation data of clobazam using LCMS-IT-TOF

Compounds	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Linearity range (ng/mL)	Correlation coefficient (r ²)
CLB	2.0	6.0	10-500	0.9973
DMCLB	5.5	16.6	10-500	0.9968

日内及び日間変動は、異なる 4 濃度 (25、100、200 及び 500 ng/mL) において、各々精密性は 1.1-13.1% 及び 3.9-16.7%、正確性は 99.3-100.9% 及び 94.8-103.4% であった。

(3) MALDI-TOF/TOF 分析系の開発

ラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* 実験より、サンプルターゲットプレートを用いた MALDI-TOF/TOF の定量性の確保にも、重水素標識標準物質が有用であるという知見を得た。

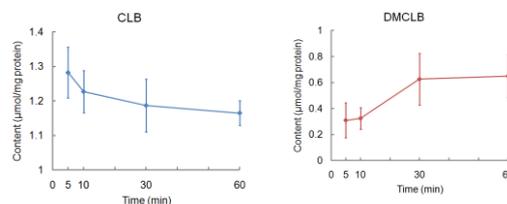


図 2 Metabolism of clobazam in rat liver microsomes

(4) MS 分析を目的とした試料直接注入分析カラムの検討

疎水性/親水性ハイブリッド ODS 固定相を充填した分析カラム (Cadenza HS-C18) は、従来不可能であった有機溶媒でのグラジエント溶出を可能とした。クロマトグラム上にミカファンギンの妨害ピークは認められなかった。MCFG の 0.5~20 µg/mL の範囲において

良好な直線関係が得られた。また、定量限界 (S/N=10) は $0.3 \mu\text{g/mL}$ であった。日内再現性試験の結果、MCFG の真度は-19.4%~2.8%、精度は C.V. 値 9.8%以下であった。

近年、新薬開発の Phase 0 と位置づけられる MD 臨床試験が脚光を浴びている。本研究の最終的な目的は、MD 手法を TDM に応用した新たなテーラーメイド医療を実現することである。本研究では、MD 手法に応用可能な種々の高感度 MS 血中濃度分析法を開発した。今後、TDM 対象薬物の血中濃度パラメータおよび代謝プロファイルの評価に応用し、患者の C_{max} 、半減期等の薬物動態プロファイルを求め、MD 対応の超高感度測定系が臨床応用可能であることが示されることを期待したい。

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)

①大森智史, 川合麻未, 中村光浩, 谷口和美, 井口和弘, 伊藤善規, 白井茂之, 平野和行. 抗てんかん薬の HPLC 分析に適した生体試料前処理法および分析カラムの評価. ぎふ病薬, (印刷中)

[学会発表] (計 3 件)

① M. Nakamura, et al. Simultaneous determination of sphingolipid metabolites by LC/MS-IT-TOF using Kinetex Core-Shell HPLC column. 53rd International Conference on the Bioscience of Lipids. Sept. 6th~8th, 2012, Banff, Canada.

②川合麻未, 中村光浩, 井口和弘, 白井茂之, 門口泰也, 土屋照雄, 佐治木弘尚, 平野和行. Measurement of clobazam in plasma by the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. 第 21 回日本医療薬学会年会, 2011 年 10 月 1~10 月 2 日, 神戸.

③川合麻未, 中村光浩, 井口和弘, 白井茂之, 門口泰也, 土屋照雄, 佐治木弘尚, 平野和行. MALDI-TOF MS による血漿中クロバザムの測定. 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 28 日~3 月 31 日, 静岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 和行 (HIRANO KAZUYUKI)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 90057365

(2) 研究分担者

中村 光浩 (NAKAMURA MITSUHIRO)
岐阜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 30433204
佐治木 弘尚 (SAJIKI HIRONAO)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 50275096