

生体試料中薬物濃度測定法の最近の進歩

医薬事業本部 ファーマ事業所 齊藤 嘉一

1 はじめに

医薬品の開発において、薬物動態（PK）評価は、化合物の物理化学的性質と薬効薬理評価、安全性薬理評価、安全性評価、製剤開発、臨床評価とを結ぶ重要な研究分野である。この薬物動態では、対象となる医薬品候補化合物を、様々なin vitro試験（吸収、代謝、酵素阻害・誘導など）で得られるデータや、in vivo試験で得られる生体試料（血漿・血清、尿、組織など）中の薬物濃度を定量して求めた薬物動態パラメーターで、解析評価する。

非臨床評価の安全性評価において

は薬物の曝露を確認し、毒性所見への関与を評価し、臨床評価ではヒト・パラメーターの取得をするのも、各試験で得られる生体試料中の薬物濃度からである。

生物由来の様々な生体成分と本来は異物である薬物を巧く分離・精製して、定量性の優れた分析手法により薬物の濃度を求めるために、様々な手法が考案されてきた。例えば、機器分析ではGC、HPLC、GC-MS、LC-MS、LC-MS/MS等であり、免疫学的手法を用いたRIA、EIA、ELISAなども用いられてきた。これらの手法は使われ続けているが、現

在の主流はLC-MS/MSを用いた定量分析となっている。

2 HPLC法による生体試料中の薬物定量分析

HPLCで生体試料中の薬物濃度を測定するには、まず、生体成分との分離が必要である。

薬物自身の物理化学的性質により、蛋白成分のみを除く除蛋白法、有機溶剤への抽出を行う液-液抽出法、担体を利用した短いカラムに吸着させて抽出する固相抽出法を使い分け、必要に応じてさらに精製を施したり、除ききれなかった夾雑物と区別する

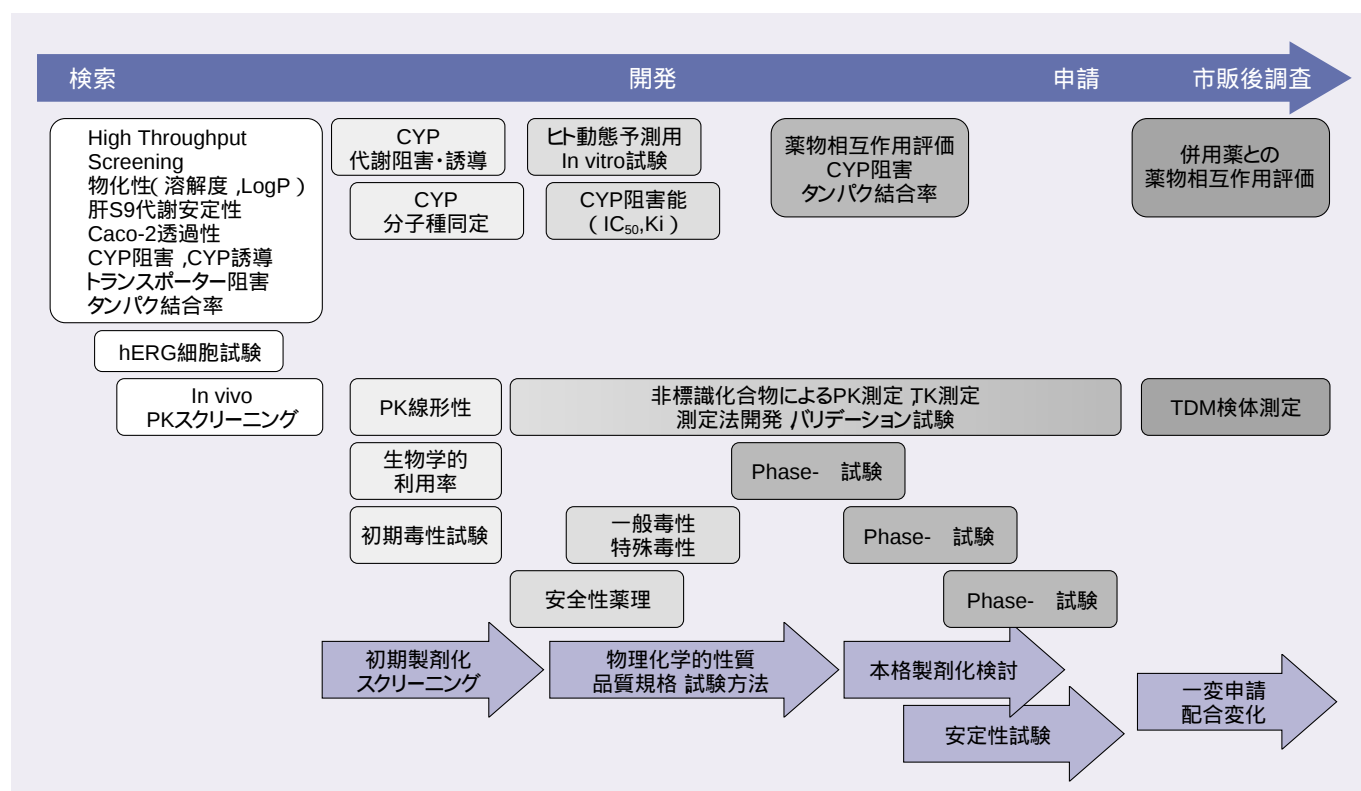


図1 医薬品開発の流れ

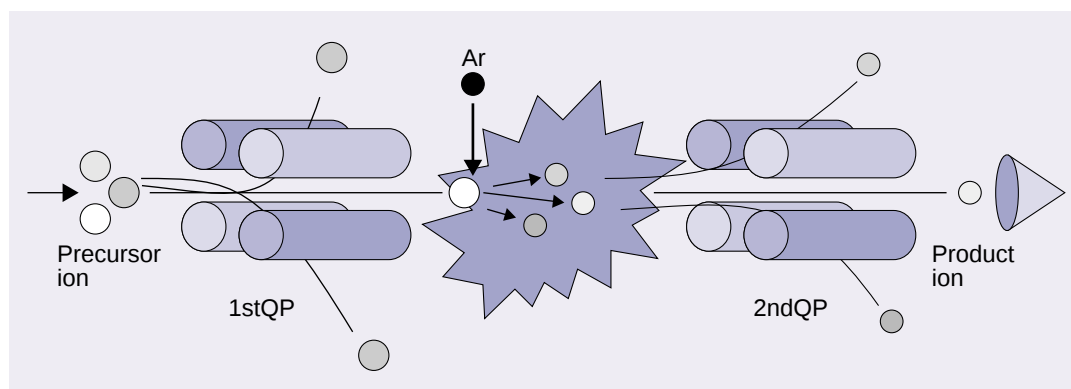


図2 LC-MS/MSのタンデムQPシステム

イオンを検出しないため、夾雑物との分離が検出器側で可能となる。検出器側で分離が可能であるならば、生体試料そのものを直接分析装置に掛けられそうであるが、薬物に比べ大量に存在する生体

ために、UV吸収（HPLC-UV法）や蛍光検出（HPLC-FR法）できない化合物では誘導体化したりと、機器分析にかけられるための十分な前処理を実施する。HPLCでの定量分析では、この前処理段階で測定対象薬物を如何に精製して、分析の支障となる夾雑物を如何に除くかが分析時間、感度、精度に関わってくる。前処理での精製が不十分ならば、HPLCのカラム分離に時間をかけるため、溶出時間が長くなり、ピークも拡散して感度が得られず、内部標準物質との誤差も生じやすい。

3 LC-MS/MS法による生体試料中の薬物定量分析

LC-MS/MSはHPLCの検出器部分が質量分析器となったものと理解いただきたい。多くの場合、タンデム型質量分析器と呼ばれるように四重極型分析器が直列に並べられている。イオントラップ方式のものもあるが、四重極が目的イオンを直進通過させるのに対し、イオントラップは名の通り、いったんイオンを溜めて、アルゴンガスと衝突させるクラッキン

グを行い、その後検出すべきイオンを検出器へ導く形式である。溜めるか、通過させるかの違いはあるが、本質的には同じ原理であるため、今回はタンデム四重極型で説明する。生体試料中の分析では前処理後のサンプルを、液体クロマトグラフィーで分離溶出後に、大気圧下でイオン化し、最初の四重極で、 $M+1$ や $M-1$ など薬物特異的な質量イオン（precursor ion）のみを通過させ、クラッキングを経て次の四重極では特異的生成する薬物の部分質量イオン（product ion）をのみ通過させてイオン量を検出することでクロマトグラフを作成する。

目的とする質量イオンを通過させるための条件は、マイクロ秒単位で切り替え可能なため、どちらかの四重極で通過させる質量イオンさえ異なれば、溶出時間がまったく同じであったとしても別の質量軸のクロマトとして区別し、ピークとして捕らえることが可能となる。逆に、検出しない条件であれば、たとえ何らかの成分が溶出されていても質量

成分がイオン化を阻害したり、蛋白結合率の影響で測定できる量が限られたりするため、サンプル精製は必要である。しかしながらLC-MS/MS法では、HPLC-UV法やFR法に比べて前処理での精製度合いやLCカラムでの分離が不十分であっても定量を行うことが可能となる。ただし、夾雑物の中には少量でも薬物のイオン化を阻害するものもあるため、注意が必要である。

4 創薬初期の段階の薬物定量分析

創薬初期の段階では、血漿から蛋白のみ変性させ、取り除き、LC-MS/MSで未変化体（薬物そのもの）のみを分析することが多い。内部標準物質も類縁体か、既知の標準物質を用い、分析時間も短くして（1サイクル5ないし10分未満）、時間優先で進めることが多い。投与媒体中に薬物を溶解させるために用いられる界面活性剤や高分子化合物の中には、薬物あるいは内部標準物質のイオン化を妨げるものがあり、その影響が大きいと思われる投与経路・経過時間のサンプルを扱うときには、

前処理で十分な精製（液 - 液抽出法，固相抽出法）が必要であり，内部標準物質も物理化学的な性質が測定目的化合物とほぼ同じで質量のみ異なる安定同位体元素（多くの場合重水素D）を含むものを利用するのが望ましい。

5 非臨床評価段階の薬物定量分析

非臨床評価段階では，未変化体のみならず，代謝物も測定することが大半である。LC-MS/MSの特徴として，質量さえ異なれば，カラムで十分に分離しなくとも定量可能ではあるが，代謝物は多くの場合，位置違いの酸化，例えばフェニル基のオルト，メタ，パラ位の酸化，ベンジル位の酸化等で生じる異性体が存在する。そのため，これら同じprecursor ion，同じproduct ionを与える代謝物同士を分けるためには液クロの分析カラムで十分に分離しておく必要がある。中には未変化体とまったく同じprecursor ion，product ionを示す代謝物もある。不斉炭素がある場合などの異性化や，脱メチル化と酸化といった2段階の代謝で質量に変化がない場合である。薬物の構造により，あらかじめ可能性の判別はできるが，確認するにはproduct scanでわずかな差を探すか，光学活性カラムの使用あるいはジアステレオマーへの誘導化を行い，新たな分析方法を構築する。代謝物が多い場合には分析に要する時間は長くなり，1サイクル30分を要する

こともある。

非臨床段階ではToxicokinetics（TK）として申請用データに使われるため，測定もGLP適合試験として実施する。そのため，測定法はあらかじめバリデートされていることが必要である。

薬物の未変化体，代謝物を測定する分析方法を検討し，バリデーション検討項目，特異性・直線性・日内変動・日間変動・安定性などを測定して基準以内であれば初めて分析方法が確立する。この検討・バリデーション工程は，試行錯誤もあり，時間がかかりはするが，分析方法の信頼性を高め，後の検体測定においてトラブルなく試験を進行させる重要な工程である。

6 臨床評価段階の薬物定量分析

臨床評価段階になると，対象がヒトとなり，安全域での試験となるため，非臨床評価よりも高感度化が必要である。最新の高感度機種を使い，必要であればマトリックス量を多くして抽出濃縮して求められるが，通常の臨床試験の場合，薬効域の下限よりも1桁下まで測定できれば，必要な薬物動態パラメーターを得ることができるので，むやみに高感度化

を勧めるものではない。ただし，マトリックス量を減らす目的で，高感度機器を指定される場合もある。また，in vitro試験で先に確認されているが，臨床試験において始めて検出されるヒト特異的代謝物が出た場合などは，それを含んだ定量方法を確立する必要がある。

7 市販後の薬物定量分析

副作用や誤飲，あるいはTDM（therapeutic drug monitoring；治療時に薬物が有効且つ安全域にあることを確認する）の目的で生体中薬物濃度を測定する場合がある。このときの対応にはスピーディーであることが要求される。そのため汎用性があり，分析時間の短いLC-MS/MSを第一選択として対応している。

8 最近の取り組み

8.1 前処理手法

生体試料中の薬物濃度測定では，前処理と機器分析の両方が重要であることを記述した。

この前処理工程を効率よくするために，なるべく手間隙を掛けない方法を選択する。第1選択は除蛋白法であり，2番目が固相抽出法となる。

	(hr)	~9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19~
オンライン自動固相抽出装置		サンプリング	前処理	測定								
通常の固相抽出		サンプリング	前処理								測定	

図3 オンライン前処理装置の効果

前処理が除蛋白ですむ場合には無機物をはじめ様々な夾雑物を含むので、流路が汚れやすいため、LC-MS/MSのメンテナンスを頻繁に実施する必要があります。一方、固相抽出の場合は物理化学的性質の似た夾雑物のみとなっているので、メンテナンス頻度は少なく済む。この固相抽出法は、固相内に一旦目的化合物を吸着させ、洗浄し、溶出して精製度を向上させる方法なので、バルブ等の切り替えを用いれば液クロ上でもプレカラムとして操作が可能であり、HPLC時代からもカラムスイッチング法として利用されてきた。操作が煩雑であったり、プレカラムの洗浄や交換が律速となったりで、第一選択として用いられることは少なかったが、前処理操作としては簡便で且つ確実性があるため、各メーカーで固相抽出法の自動化が図られている。マトリックスをそのまま注入し、オンラインでLC-MS/MSにかけることは、メ

ンテナンスさえ楽であれば非常に効率的であり、人的ミスも最小限に抑えられる。S社のオンライン自動前処理装置をLC-MS/MSに取り付け、検証した結果、実際に分析では内部標準物質を添加するため、血漿の希釈操作があり、まったくの全自動ではないが、検体のサンプリングから分析器にかけるまでが3分の1の時間となり、測定全体も短い期間で終了した。

8.2 超高压クロマト手法

LC-MS/MSで使用する分離カラムに充填されている担体の直径は通常

3.5 μm である。これを1.7 μm にすれば、同じ空間に占める担体の表面積は2倍以上になり、理論段数も増え、短時間で分離が可能となる。ただし、カラムの密度も上がるため、より高压の移動相が必要となる。

W社の超高压液体クロマトシステム(UPLC)を用いて、多成分の同時定量で検証した結果、ピーク幅も短くシャープな分離性を保ったまま、分析時間は激減した。検体数の多い試験ほど測定サイクルが短くなることのメリットは大きく、今後益々活用されることが推測される。

9 おわりに

創薬研究・育薬研究等の医薬品開発における研究活動への支援、非臨床評価・臨床評価等の医薬品開発における申請活動への支援を、生体試料中の薬物濃度を測定することで実施している。今後も最新の技術をいち早く取り入れ、より信頼度の高いデータを、簡便且つ短時間の作業で得られるようにする努力が必要と考えている。

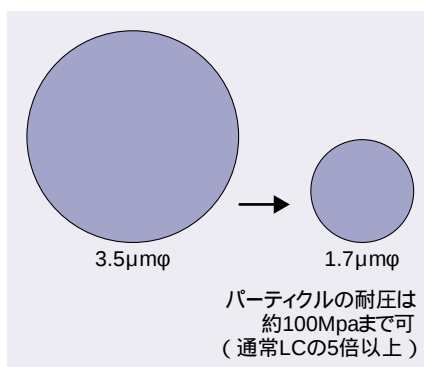


図4 1.7 μm パーティクル担体

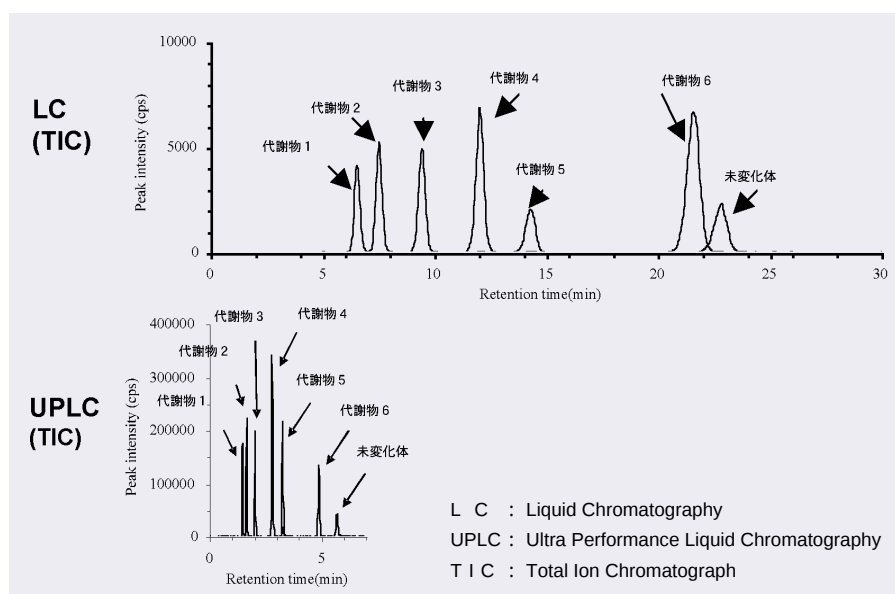


図5 溶出時間の劇的な変化



齊藤 嘉一
(さいとう よしかず)
医薬事業本部
ファーマ事業所