

# 生体試料中微量薬物濃度測定の実況と今後の展開

ファーマ事業部 城 良典

## 1 はじめに

安全性の確保が重要である医薬品の開発工程において、開発候補化合物の薬効及び毒性を確認するために動物に開発候補化合物を投与する非臨床試験や人(健康人及び患者)に投与する臨床試験が行われている。各試験において、生体試料中の薬物濃度を正確に測定することは大変重要な項目であり、しかも安全性を高めるために開発化合物だけでなくその代謝物をも含め、更に低濃度まで測定することが要求される傾向にある。

そのため、微量薬物濃度測定には、高速液体クロマトグラフの検出器に二重収束型質量分析計(LC-MS/MS)を用いた高感度で正確な測定値を得ることが可能な測定方法が主として用いられている。

弊社は、1981年から微量薬物濃度測定の実務を開始し、LC-MS/MSについても他社に先駆けて実務を行ない、本誌を始め測定原理や測定例を報告<sup>1),2)</sup>している。

本稿では、弊社における生体試料中薬物濃度測定の実況と今後の展開について紹介する。

## 2 LC-MS/MSについて

紹介の前に、生体試料中薬物濃度測定の実力となっているLC-MS/MSについて簡単に説明する。

### 2.1 液体クロマトグラフ

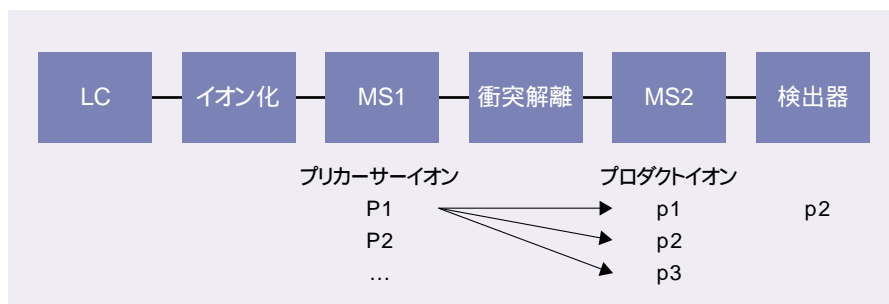


図1 LC-MS / MSの構成と測定原理

LCは、通常使用されるものと同じであるが、溶離液にイオン化を阻害する緩衝液が使用できない、MSへ試料を導入するために内径が小さく長さの短い（例：2.1 mm I.D. x 150 mm L.）カラムが必要などの制限がある。

### 2.2 MS / MS

LCからMS/MSへ導入された目的化合物は、窒素ガスと共にイオン化室にスプレーされ、溶離液を除去すると共に各種のイオン化法によりイオン化される。

よく使用される1段階目MS部のイオン化の方法にはESI (Electrospray Ionization) 法、APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) 法やAPPI (Atmospheric Pressure Photoionization) 法などがあるが、弊社ではESI法を多用している。

イオン化部で発生したイオンは四重極型のMS部に導入され、定量に必要な特定のイオン（プリカーサーイオン）だけを通過させる。

2段階目MS部ではアルゴンガスなどの希ガスに通過イオンを衝突させ、更に小さな質量数のイオンに変化させ、四重極型のMS部に導入させて、目的化合物に起因する特定のイオン（プロダクトイオン）を検出する（図1）。

以上のような測定原理により、LC-MS/MSは、数多くの夾雑物の中から目的化合物を高感度で定量することが出来る装置である。

また、LC-MS/MSのメーカーでは、更に高感度の機器を開発しており、弊社でも現時点では最も高感度であると考えられるAPI4000 (Applied Biosystems 社)を導入し、前処理技術と合わせ、ソフト、ハード両面で高感度測定への体制を整えている。

## 3 現状

弊社は、生体試料中の薬物濃度測定法の開発から測定法バリデーション試験、検体測定までを一貫して実務可能な施設であり、微量薬物濃度測定を求めお客様の高度なニーズにもお応えできる体制を確立している。

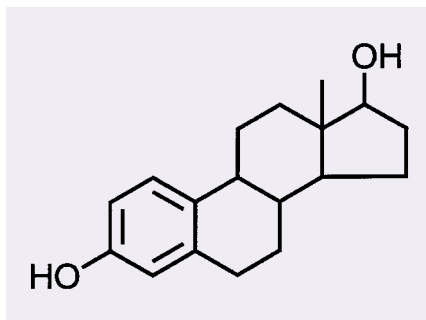


図2 エストラジオールの構造式

### 3.1 測定法の開発事例

特に薬物濃度測定法の開発に関するご依頼については数多くの実績があり、その例を以下に紹介する。

#### 3.1.1 誘導体化による測定法の開発

女性ホルモン（エストロゲン）の一つであるエストラジオール（図2）は、閉経による女性ホルモンの分泌量減少に起因する更年期障害や骨粗鬆症などの治療に使用されてきたが、

血中のエストラジオールを測定する方法は、これまで抗原抗体反応を利用したラジオイムノアッセイ（RIA）法などが主として使用されているが、この方法は交差性やキット間に性能差があるなど、操作性や信頼性に問題があった。

弊社ではエストラジオールの高感度、高精度で操作が簡便な手法を開発すべく、LC-MS/MSを測定機器に用いた測定法の検討を行った（図3、図4）。

エストラジオールは、LC-MS/MS（APCI法）で特異的なプロダクトイオンが認められなかったため、エストラジオールを誘導体化する方法を検討することにより、非放射能条件下で前処理操作が簡便な高感度、高精度が得られる方法を確認し、特許出願<sup>3)</sup>している。

#### 3.1.2 薬物動態初期評価試験検体測定法の開発

新規医薬品の開発候補化合物を選定する基礎研究段階においては、開発候補化合物になる前段階の化合物を動物に投与し、生体試料中の薬物濃度を調べることにより薬効及び毒性を確認する薬物動態初期評価試験が重要である。

この薬物動態初期評価試験では、測定法が確立されていない化合物の生体試料中の薬物濃度を迅速に測定することにより、その化合物を医薬品として研究を継続するか否かの判断や化合物の再設計の基礎データ取得を短時間で行うことが可能となる。弊社では、今までに蓄積した測定法開発のノウハウを基に、LC-MS/MS法による試験法作成から検体測定までを短時間で行う測定システムを構築している。

また、小動物に化合物を投与後、採血し、その後の血中濃度測定をセットで行うことも可能である。

### 3.2 品質の確保

弊社で測定した結果の品質保証については、1994年からGLP体制に

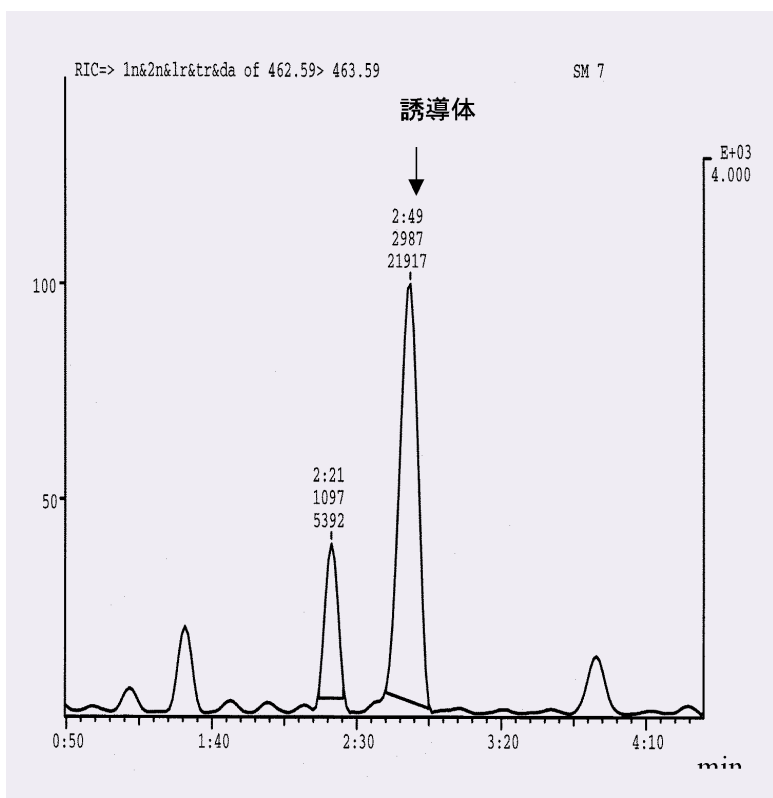


図3 エストラジオール0.5pg注入時のクロマトグラム

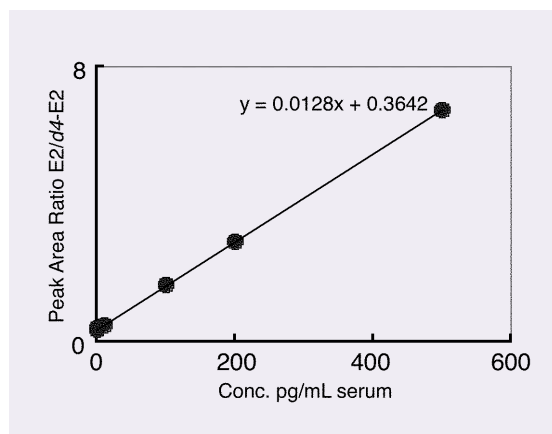


図4 エストラジオールの検量線

よる受託体制を取っており、1998年及び2000年には、医薬品機構のGLP適合調査を受けて、トキシコキネティクス測定に関して評価結果でAをいただいた。

また、海外申請にも対応したデータを取るため、米国FDAのガイダンス<sup>4)</sup>に準拠した内容の試験も実施している。

#### 4 今後の展開

弊社では、今後更にお客様に満足していただける受託機関を目指し、下記のような計画を進めている。

##### 4.1 21CFR Part11への対応

新規医薬品の開発においては、グローバル化の方針によって米国FDAへの承認申請を行う医薬品メーカーが増えており、測定データに関しては、1997年に公布された21CFR (Code of Federal Regulations) Part11 (Electronic Records, Electronic Signatures) に対応したクローズドシステムの構築・運用が要求されており、測定機器メーカーも各種の対応可能な装置を発表している。

それに伴い弊社のような試験受託機関においても、このニーズに対応して体制整備を進める必要があるが、市販されているシステムはまだFDAの要求に対して不完全なところもある。現在は、弊社でもFDAや製薬業界の動向、及び測定機器メーカーの対応状況などを調査しており、対応策の検討を進めているところである。

##### 4.2 LIMSによる信頼性の向上

開発された医薬品について、厚生労働省への新薬承認申請が問題なく行われるためには、取得した測定結果及び報告書に対する信頼性の確保が絶対条件であり、生体試料中の薬物濃度測定を請け負う弊社としても、従来から信頼性の確保に注力してきた。

しかし、測定操作、結果の確認及び報告書の作成に人間の介在がある限り、ヒューマンエラーを根絶することは不可能と考えられるため、人間の関わる工程を少なくする目的で、Laboratory Information Management System (LIMS) を構築中である。

このシステムにより、測定機器で得られたデータ処理から報告資料の作成までを、人の介在無く自動的に行われるため、転記ミスや確認ミスが無くなり、測定結果の信頼性が大幅に向上することになる。

また、このLIMSに組み合わせて、多検体処理プレートの使用による前処理工程の自動化なども検討しており、ここでも人の介在を少なくして操作ミスを減らすことができるため、更なる測定結果の品質向上が見込まれる。

##### 4.3 CE, CE-MSの利用

従来のLCでは、高極性化合物を保持することが難しく、LC-MS / MSでは溶離液組成の制限などでLC以上に制約を受けるため、高極性化合物を満足に測定出来ないのが現状である。

このような高極性化合物にCE

(Capillary electrophoresis) を用いると、比較的容易に分離・定量が可能であり、検出器に質量分析計 (MS) と組み合わせたCE-MSや高感度測定を狙ったLC-MS / MSの検討にも着手している。

#### 5 おわりに

以上のように生体試料中微量薬物濃度測定に関する現状と今後の展開について述べたが、弊社も技術力の向上や業務の効率化について積極的に取り組んでいるところである。

また、1昨年発足した新規技術を開発するバイオ技術センターとも連携を強化しながら、品質、技術力、納期及び価格などで、お客様に満足していただける受託機関を目指していきたい。

#### 文 献

- 1) T.Tanigawa, Y.Mizo-oku, K.Moriguchi, T.Suzuki et al. J.Chromatogr. B,683,135 (1996).
- 2) 松崎和恵, 溝奥康夫, 鈴木隆, 木村寛三 分析化学, 45, 101 (1996).
- 3) 松崎和恵, 安田多希, 溝奥康夫, 土井侃, 鈴木隆 特願平10-301584
- 4) Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation (U.S. Department of Health and Humans Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), May 2001).



城 良典  
(しろ よしのり)  
ファーマ事業部