

Review

マイクロドーズ臨床試験のための LC/MS/MS 高感度測定技術

富樫一天¹・牟田口国則¹・山口 建¹・小室勢津子¹・山下伸二²

Highly Sensitive Quantification Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for a Microdose Analysis in Clinical Trial

Kazutaka Togashi¹, Kuninori Mutaguchi¹, Takeru Yamaguchi¹, Setsuko Komuro¹, Shinji Yamashita²¹Pharmaceutical Business Division, Pharmaceutical Analysis Osaka Laboratory, Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.,

1-135, 3-chome, Kasugade-naka, Konohana-ku, Osaka 554-0022, Japan

²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University,

45-1, Nagaotoge-cho, Hirakata, Osaka 573-0101, Japan

Abstract

The objective of microdose (MD) clinical study is to obtain human pharmacokinetics data at earlier phase of drug development, which is more informative than animal data to screen new drug candidates and improve success rate of drug development. Currently the MD study is a new approach for clinical study, which is examined actively in Europe, the USA and Japan. In the MD study, an ultratrace dose of less than one hundredth of the therapeutic dose of drug is administered to human subject, hence it requires the measurement technology with high sensitivity. The purpose of this report is to represent the methodologies of high sensitive quantification by LC/MS/MS (liquid chromatography–tandem mass spectrometry) for a microdose clinical trial and we try to mention about availability for cold MD study using LC/MS/MS analysis.

Keywords: Microdose, LC/MS/MS, Bioanalysis

緒言

医薬品開発は、候補化合物を見つける基礎研究の段階から、「選ばれた候補化合物の有効性や安全性などについて動物を使ってテストする非臨床試験」、とその後に実施される「動物を使って有効性や安全性が確認できた候補化合物を、ヒトを対象に実施される有効性や安全性を確認する臨床試験」とに大まかに分類される。医薬品開発で実施される投薬試験においては、開発化合物を投与された被検体である動物やヒトにおける様々な反応が観察される。とりわけ、被検体

から採取された生体試料（血漿、尿、各種組織片など）中に存在する薬物濃度を測定することは、開発化合物の薬物動態情報を得るためにたいへん重要である。薬物動態情報とは、生体内において薬物が処理される過程のことであり、吸収（Absorption）、分布（Distribution）、代謝（Metabolism）、排泄（Excretion）それぞれの頭文字をとって、ADMEと略される。開発化合物のADMEを評価するために、非臨床試験や臨床試験から得られる生体試料中の薬物濃度を測定することをバイオアナリシス（Bioanalysis）と呼び、測定対象とし

¹株式会社住化分析センター医薬事業本部ファーマ大阪事業所
〒554-0022 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1-135

Tel: 06-6466-5373

Fax: 06-6466-5479

E-mail: k.togashi@scas.co.jp

²摂南大学薬学部

〒573-0101 大阪府枚方市長尾峠町45番1号

ては、投与された開発化合物そのものである未変化体以外に生体内で代謝を受けて発生する代謝物も含まれる。また、生体試料中には生体内化学物質も含まれており、これらの中には生体機能反応の指標となる化学物質があるため、これを薬物作用の評価に利用することができる。このような生体内化学物質のことをバイオマーカーと呼び、これらの増減を観察することで疾病に対する医薬品の薬効・薬理作用や毒性評価の指標として用いることもある。これは従来の ADME 評価とは異なるが、医薬品本来の目的を確認するための重要な要素であり、薬物動態研究において、今後バイオマーカーは欠かせない評価対象になると考えられる。このように、生体試料中からは、開発化合物に関わる様々な情報を得ることができるため、分析機器を駆使した測定技術が発達してきた。中でも質量分析計による寄与は大きく、今日の医薬品開発において測定技術の主流となっている。

以下の本文で、マイクロドーズ (Microdose, MD) について概説する。

1. マイクロドーズ (Microdose, MD) に関する世界での取り組み

医薬品開発の成功確率は、候補化合物を絞り込む探索段階から数えると五十万分の一とも、百万分の一ともいわれている。何万もの化合物の中からスクリーニングにより選ばれた候補化合物は、前臨床といわれる動物試験フェーズで少なくとも1年以上、ヒトへの投与による臨床試験フェーズで7年近くの年月を費やすため、一つの医薬品が上市されるためには約10年もの開発期間が必要となる。また医薬品開発プロジェクト一つあたり百億円近いコストが掛るが、医薬品開発の成功率は100%ではないため、中止されたプロジェクトの開発コストを上乗せすると、一つの医薬品を上市するために数百億から一千億円もの巨額な投資が必要ともいわれている。このように、医薬品開発における時間とコストはもっとも重要な課題として認識されている[1]。また、医薬品開発の成功確率は、ヒト Phase 1 試験に入った後も10%に満たないとさえいわれている[2]。非臨床段階では、動物による安全性評価からヒトを対象としたときの安全な投与量と用量範囲の推定を行う他、病態モデル動物やトランスジェニック動物を用いた薬効評価も行われる。しかしながら、これらの評価方法が十分に薬物のヒトへの作用を評価できているとは言い切れない。そのため、ヒト肝臓組織を用いた *in vitro* 評価方法など、開発医薬品によるヒトへの作用の予測に関わる研究が盛んに行われているが、いまだ方法論が十分に確立されているとは言い難い状況である。

マイクロドーズ (Microdose, MD) 臨床試験は、動物データだけでは予測が難しいヒトにおける薬物動態に関する情報を、医薬品の臨床開発の初期段階に得ることで、候補化合物のスクリーニングや開発の成功率向上を目指す目的で用いられる新たな臨床試験の取り組みである。MD の概念は、2004

年にヨーロッパ医薬品庁 (European Medicines Agency, EMA) から発出された「Position Paper on Non-clinical Safety Studies to Support Clinical Trials with a Single Microdose」に「ヒトにおいて薬理作用を発現すると推定される投与量の1/100を超えない用量または100 µg のいずれか少ない用量の被験物質を健康な被験者に単回投与することにより行われる臨床試験」と定義されている[3]。これは従来行われてきた臨床試験、Phase 1、2、3との対比から、Phase 0とも呼ばれている。従来の臨床開発よりもできるだけ早期にヒトにおける投与データを得ようとする考えは、かねてより探索的 (exploratory) 手法として知られており、それを受けた position paper が EMA から公示されることにより、ヒトによる MD 臨床試験の実施が世界で初めて公的に認められたのである。その後、2006年には、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) から「Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers. Exploratory IND Studies」が公示され、EMA の MD 臨床試験をベースとして、薬理作用を示す投与量で行う早期探索的臨床試験 (Exploratory Investigational New Drug, e-IND) の概念が提唱された[4]。さらに、2008年には、日本でも「マイクロドーズ臨床試験の実施に関するガイダンス」が発出された[5]。その後、これら日米欧のガイダンスは、医薬品開発に関連する規制ハーモナイゼーション活動である ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) において統一され、ICH-M3 (R2) ガイダンスに集約され、日本では、「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」として2012年に公表された[6]。

MD 臨床試験実施を巡っては、非線形性など多くの問題点が指摘されており、MD 臨床試験への疑念が、実施に対する否定的意見へとつながっている。世界における MD 臨床試験の取り組みにおいても、こうした疑念を検証する目的で実施された基盤研究がいくつか報告されている。MD 臨床試験に関する世界初の試みは、2005年英国にて実施された CREAM (Consortium for Resourcing and Evaluating AMS Microdosing) [7] トライアルであり、その後、2006年欧州で実施された EUMAPP (European Microdosing AMS Partnership Program) [8] がある。これらのプロジェクトでは、いずれも AMS (Accelerator Mass Spectrometry) が用いられており、既承認薬を含む数種の薬剤 (CREAM: 既承認薬 4 種、未承認化合物 1 種、EUMAPP: 既承認薬 6 種、未承認化合物 1 種) について MD 臨床試験を実施した。各薬剤の¹⁴C 標識体を MD 経口・静脈投与し、非標識体の経口臨床 (治療) 用量 (一部静脈投与含む) による結果と比較 (一部文献値の比較を含む) することにより、MD による線形性について焦点を当てた。また、MD 投与から得られたデータを用いて生物学的利用能 (Bioavailability, BA) やクリアランス、分布容積、半減期といった PK (Pharmacokinetics) パラメータを算出し、臨

床用量との比較も行った。その結果、線形性が得られた薬剤と非線形の結果となった薬剤が混在したが、ほとんどの薬剤については、MD から臨床用量時のパラメータを予測できると結論づけた。

以下、海外で主流とされる Hot 技術についてもっともメインとなる分析技術について紹介する。

加速器質量分析計：AMS (Accelerator Mass Spectrometry)

試料中にある炭素などの同位体存在比を測定することができる。すなわち、 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比を測定することで、 10^{-18} から 10^{-21} モルといった極めて高い測定感度を持つ分析機器である。長半減期放射性同位体の特異的に測定できる特性を有することから、考古学分野で年代測定に用いられてきたが、超微量な放射線核種を超高感度で測定できるので製薬分野でも利用されてきた経緯がある。 ^{14}C といった長半減期放射線同位体標識した開発化合物を投与することで、生体試料中の未変化体を高感度に測定できる他、LC による分離分取をすることにより、代謝物を容易に検出できるため、ヒト体内における医薬品の物質収支 (投与された開発化合物が体内でどのように吸収され、代謝・排泄されるか) を把握するためのマスバランズ試験に活用されている。

陽電子放射断層撮影法：PET (Positron Emission Tomography)

陽電子 (Positron) 検出を利用した断層撮影技術であり、医療分野において、癌診断や脳機能などのイメージングとして活用される。医薬品開発における応用としては、 ^{11}C や ^{18}F といった半減期の短い陽電子放出核種で標識した開発化合物を投与することで、体内での組織移行や分布を非侵襲で観察することができるため、医薬品開発における POC (proof of concept) 評価を的確かつ迅速に行えることが期待される。

2. 日本における MD の動き

2008年6月、日本においても厚生労働省から MD 臨床試験に関するガイダンスが公表され、実施に関する基本的な考え方が示された。先述のような放射線核種を用いる AMS や PET といった手法のことを Hot 技術と呼ぶのに対し、LC/MS (Liquid chromatograph-mass spectrometer) は非放射性検体の分析であるため Cold 技術と呼ばれる。海外では、MD 臨床試験のみならず、医薬品開発における Hot 技術の応用は進んでいる。MD 臨床試験のトライアルにおいても、AMS が主流であり、また、MD ガイダンスにおいても、EMA から発出された position paper では、測定手法として AMS と PET の Hot 技術を言及するに止まっている。日本から発出された MD ガイダンスには、AMS と PET の Hot 技術に加え、LC/MS/MS による Cold 技術についても言及している。以下、LC/MS/MS (liquid chromatograph-triple quadrupole mass spectrometry) について簡単に解説する。

液体クロマトグラフ質量分析計：LC/MS (Liquid chromatograph-mass spectrometer)

液体クロマトグラフに質量分析計を組み合わせた分析法であり、測定対象や目的に応じて用いられる質量分析計の種類もいくつかある。薬物濃度測定といった定量分析にもっとも用いられているのは、三連四重極型 LC/MS/MS である。プレカーサーイオン (precursor ion) から衝突誘起解離 (collision induced dissociation, CID) により得られるプロダクトイオン (product ion) を選択的に検出する選択反応モニタリング (selected reaction monitoring, SRM) は、高い選択性とともにより pg/mL オーダーの高感度測定を可能とするため、定量分析にもっとも活用される。また、高い分解能と質量精度を持つ飛行時間型 (time of flight, TOF) やイオントラップ型の 1 種である Kingdon trap (orbitrap) といったタイプの質量分析計は、従来、生体試料中代謝物検索といった定性分析に用いられてきたが、昨今の技術力向上により測定感度が向上し、信頼性も上がったため、定量分析に用いる例も増えてきた。高分解能を活かすことで、多価イオンとして検出されるペプチドなどの高分子化合物の定量分析に利用される。

3. NEDO マイクロドーズ

海外に遅れること 2008年10月、NEDO (新エネルギー・産業技術総合開発機構) のプロジェクト「マイクロドーズ臨床試験を活用した革新的創薬技術の開発：薬物動態・薬効の定量的予測技術を基盤として」が開始された。このプロジェクトは、医薬品の体内動態予測に関する速度論的な解析手法と、PET を用いた分子イメージング技術を融合させることによって、新たな創薬技術であるマイクロドーズ臨床試験の有効性、応用性を飛躍的に向上させ、成功確率の高い医薬品開発を可能にするという、創薬支援のための画期的な技術の開発を目的として開始された。本プロジェクトは杉山雄一 (東京大学) をリーダーとして、NEDO から医薬品開発支援機構 (APDD) が委託を受け、国内の医学研究機関と共同研究契約を結び、国内製薬企業コンソーシアム、臨床試験機関コンソーシアム及び測定受託会社コンソーシアムの協力によって、活動が実施された。その活動のいくつかを以下に紹介する。

山下 (撰南大学) 及び森本 (大分大学) らは、Ca 拮抗薬 3 剤 (ニフェジピン、ニカルジピン及びジルチアゼム) のカセットによる静脈内及び経口の MD 投与試験を行った。この試験により、MD 臨床試験における BA を算出し、また臨床用量での値との比較を行った [9,10,11]。この試験は、カセットドーズ MD 投与によって体内動態による化合物選択が可能であることを示しただけではなく、LC/MS/MS 分析を用いた同時定量によって試験期間及びコストの削減が可能であることも実証した。

さらに、山下及び森本らは、MD 臨床試験における製剤化

についても検討を行った。通常、溶液状態で経口投与される MD 臨床試験では、胃酸に対して不安定な薬物や、徐放剤化等によって吸収をコントロールしている製剤などはその吸収や体内動態に関して臨床を反映したデータを得ることができるかが不明であると考え、エリスロマイシンやシンバスタチンといった化合物を用いて MD による製剤化の検討を行った。

山下及び森本らによる Ca 拮抗薬及び製剤化検討のこれら二試験の MD 臨床試験においては、薬剤の放射性核種のラベル化を行わない方法 (Cold) により試験を実施した。いずれの試験についても、血漿中濃度測定は株式会社住化分析センターで LC/MS/MS 測定を実施し、MD 臨床試験において Cold 化合物でも十分な高感度化測定を行うことで、薬物動態評価が可能であることを示した。これらの試験で用いた高感度化技術については、次項で紹介する。

一方、池田 (横浜薬科大学) らは、 ^{14}C 標識アセトアミノフェン及びトルブタミドを用いた MD 臨床試験を実施し、ヒト代謝物の検索及びマスバランスの評価、薬物間相互作用及び遺伝子多型の影響の解析が可能であることを実証した [12,13]。なお、この試験は日本で初めて ^{14}C 標識薬剤を人体に投与したものであり、日本における ^{14}C 標識薬剤を用いた試験実施の手順を明確にした意義は大きい。また、渡辺 (理化学研究所) 及び千田 (先端医療振興財団) らは、OATP1B3 トランスポーターの基質であるテルミサルタンの ^{14}C 標識体をヒトに投与し、PET で撮影を行うことによって、テルミサルタンの全身薬物動態と OATP1B3 トランスポーターの機能評価を行った [14]。

NEDO プロジェクトは3年間にわたり、上記試験を含む27の臨床試験が実施され、その成果は20以上の英文論文として発表された。試験の概要としては、 ^{14}C 標識体を用いた臨床試験 (AMS) が2件、 ^{14}C 、 ^{18}F 標識体を用いた臨床試験 (PET) が8件、非標識体を用いた臨床試験 (LC/MS/MS) が17件となっている。これらの成果を受け、国内の製薬企業も MD 臨床試験の実施を検討し、既に新薬開発に MD 臨床試験を取り入れた企業もあり、MD への期待が高まっているが、実施のハードルが高いことや、MD 実施自体のメリットを疑問視する声も多く、実際の医薬品開発で実用されるには、有用性を十分に考慮した活用が必要と考えられる。次に、MD のための LC/MS/MS による Cold 高感度測定技術について、実践を踏まえ解説する。

4. LC/MS/MS による Cold 高感度測定技術

バイオアナリシス LC/MS/MS 測定における高感度化に対するアプローチは、およそ以下の三つに分類される。

①前処理における高感度化、②LC における高感度化、③MS における高感度化

以下、これらアプローチについて簡単に解説する。

①前処理における高感度化

バイオアナリシスでは、生体試料から測定対象物を効率よく抽出することで、より正確な定量値を得ることができる。そのため、それぞれの測定対象物に適した前処理方法を設定する必要がある。バイオアナリシスで用いられる一般的な前処理法として、除タンパク法、液液抽出法、固相抽出法等が挙げられる。目標とする定量下限濃度 (lower limit of quantification, LLOQ) の検出感度が十分に確保でき、かつ十分な定量性を確保できるように、試料量と測定対象物質の効率的な前処理法を選択しなければならない。高感度化測定を目的とする前処理方法は、生体試料からの測定対象物の回収率 (抽出率) をできる限り高くする必要があり、また、クロマトグラム上の妨害や測定対象物のイオン化の妨げとなるような生体試料由来の夾雑物を十分に除去する必要がある。前処理における試料濃縮とは、生体試料から測定対象物質を抽出し、測定注入試料を調製するまでの過程において、最初に採取した生体試料の使用量 (サンプリングに供した生体試料量) よりも最終的な測定注入試料量を小さくすることで、試料を濃縮することである。すなわち、血漿などの生体試料の使用量を可能な限り多くサンプリングし、測定対象物質を効率的に抽出した溶液を蒸発乾固により留去 (Dry up) した後、LC 移動相などの最終溶解液に再溶解するときに、LC 注入量を考慮に入れて、できるだけ少量の溶液に再度溶解する方法を確立する。このため、高感度化測定法における前処理方法には、前処理過程において溶媒の留去が可能な、液液抽出法及び固相抽出法が、濃縮効果が期待できるという理由でよく利用される。以下、これら二つの前処理方法について、簡単な原理と注意点を考察する。

・液液抽出法 (Liquid-liquid extraction)

水と混ざらない有機溶媒を用い、物質ごとの脂溶性 (溶解度) の差を利用して生体試料から測定対象物を抽出する方法。抽出溶媒として、ジエチルエーテルや酢酸エチル、ヘキサンやこれらの混液等がよく用いられる。液液抽出法は、有機溶媒の使用量が多く、選択性は低い反面、濃縮効果が高く、抽出におけるメカニズムが単純であるため、確実性の高い前処理方法を作成できる可能性が高い。

・固相抽出法 (Solid phase extraction)

固相カートリッジにおいて、測定対象物質及び生体試料中の夾雑物質の固定相との親和性の差を利用して、選択的に測定対象物の精製及び濃縮を行う方法。固定相にはシリカやポリマーといった樹脂に炭化水素鎖やフェニル基等の疎水性基を導入したものや、同じく樹脂にアミン基やスルホン酸といったイオン交換基を導入したものがある。固相抽出法は、有機溶媒の使用量も少なく、固相カートリッジを適切に選択することで、より選択性の高い測定方法を作成できる。

前処理における高感度化は、試料濃縮以外に、LC におけ

るオンライン濃縮も前処理における高感度化のひとつと考えることができる。その他、測定対象物に強イオンを導入するといった誘導体化による高感度化も考えられるが、分析法の確立が困難であること、また、反応試薬の除去が必要になる等前処理操作も煩雑になる可能性が高い。

②LCにおける高感度化

バイオアナリシスにおけるLC条件の重要なポイントのひとつとしては、生体試料中の夾雑物との分離にある。マトリックス効果による感度低下を回避するためにも、測定対象物をLCカラム内で適正に保持させ、生体試料中夾雑物とピークが重ならないように分離できる条件を設定することが望ましい。シャープなピーク形状が得られるようなLC条件を設定することも重要であり、ピーク形状をできるだけシャープにすることにより、ピーク高さが得られるため、見かけ上の感度を少しでも上げることができる。これらの条件が兼ね揃えられていることもあり、昨今のバイオアナリシスにおいてもカラム粒子径2μm付近を用いる超高流速型LCがもてはやされた。

もうひとつの重要なポイントは、試料濃縮である。LC-MSによく用いられるESI (Electrospray ionization) 法では、感度が試料濃度に依存するため、可能な限り試料を濃縮することが感度に有利とされている。試料濃縮効果を期待し、より内径の小さい分析カラムを使用することが多い。また、線速度を一定に考えた場合、カラム内径を小さくすることで移動相の流速も低くなるため、イオン化の重要な要素であるイオン蒸発においても有利な条件に近づく。試料濃度の濃縮には、前述のような前処理における濃縮が一般的であるが、カラムスイッチング法を組み合わせることでLCにおけるオンライン濃縮も可能となる。また、生体試料中の夾雑物との分離を目的としてカラムスイッチング法が用いられることもあるため、LCオンライン前処理の役割としての効果も期待す

ることができる。

カラムスイッチング法として、簡便な手法をふたつ紹介する。ひとつはハートカットと呼ばれる手法である。分析カラムへ試料が導入される前に、カラム長10mm などのようなショートカラムをトラップカラムとして用いる。注入された試料を一旦トラップカラム内で保持させ、測定対象物を含む分画のみを分析カラムに導入するようプログラミングする。すなわち、トラップカラムと分析カラムの間にスイッチングバルブを組み入れ、トラップカラムにおいて測定対象物の保持時間付近だけを分析カラムと連結するようにプログラミングすることで測定試料を効率よく分析カラムに導入する。これにより測定試料のクリーンアップできる他、逆相条件の場合、トラップカラムにおける移動相の有機溶媒比率を、分析カラムの移動相よりも低く設定しておくことで、より有機溶媒リッチな状態下にある分析カラム内に測定試料が導入された瞬間にステップグラジエントと同様の効果が得られるため、クロマトグラムのピークがシャープとなり、見かけ上の感度を上げることができる。参考例として、ハートカット法のカラムスイッチングの配管図を図1に示す。

もうひとつの方法は、バックフラッシュと呼ばれる手法である。前述と同様にカラム長10mm のようなショートカラムをトラップカラムに用い、トラップカラムの送液方向を分析カラム導入時に逆転させる。すなわち、正方向でトラップカラムに十分保持させた後、スイッチバルブを切り替えることで測定対象物をトラップカラムから逆方向で追い出し、同時に分析カラムに測定対象物を送り込むようにスイッチングバルブを用いて配置する。前述のように正方向でカラムスイッチする方法に比べ、条件を最適化することで夾雑物の除去率を高くできる他、比較的注入量を多くすることもできるため、良好なクリーンアップおよび濃縮方法といえる。スイッチング条件として重要なポイントは、トラップカラムで十分に保持できる条件、すなわち逆相条件の場合、有機溶媒比率

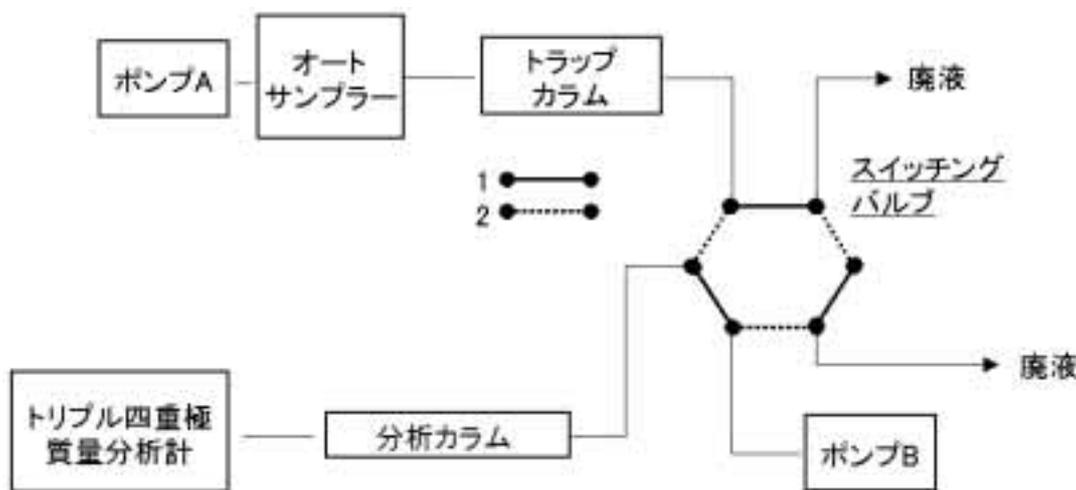


図1. カラムスイッチング配管図例1 (ハートカット)

観点から、前処理においては、生体試料から測定対象物を効率よく抽出でき、且つ試料を濃縮する方法が効果的であり、LCにおいても何らかの手段において試料濃縮することが高感度化に優位に働くが、MSのイオン化に優れた条件を考慮に入れたLC条件を構築する必要があり、測定対象物のイオン化とクロマトグラフィックな状態とのバランスを総合的に熟慮した分析条件を設定する必要がある。

LC/MS/MSによるバイオアナリシスにおいて、MD臨床試験ほど高感度化技術が必要とされる事例はないといって過言でない。そこで、上記のような高感度技術を駆使した事例として、次にシンバスタチンのMD臨床試験での分析法開発について紹介する。

④ヒト血漿中シンバスタチンの高感度定量法の開発

シンバスタチンの構造式を図3に示す。MD臨床試験において必要なLLOQは、各化合物のインタビューフォームから、MD用量における予想 C_{max} を算出した。一般的に薬物動態解析を行うためには、少なくとも C_{max} の10分の1のLLOQを測定する必要があるといわれている。MD臨床試験においては、個体差の影響などを加味し、十分な定量性を担保するためには、予想 C_{max} からさらに20~50分の1までのLLOQを確保する必要があると考え、シンバスタチンの目標LLOQを5 pg/mLと設定した。検討の結果、前処理に使用する血漿量は0.5 mLとし、シンバスタチンは酸性条件下 t -ブチルメチルエーテルで効率よく抽出されることを確認した。また、LC条件においては、ODSカラムにおいてシンバスタチンが十分に保持されることを確認した。しかし、MS条件において、シンバスタチンの選択性に問題があり、また感度も不十分なため、目標とするLLOQが確保できないことが明らかとなった。そこで筆者らは、シクロヘキサジエノールの構造を有する化合物がナトリウムやアルキルアミンと付加イオンを形成しやすいという報告を参考とし[15]、移動相にメチルアミンを添加し、シンバスタチンのメチルアミン付加イオンを観察したところ、感度は約10倍に向上し、かつ、モニターイオンが変わったことにより、選択性の問題も解消できた。その他、細かな条件検討を行うことで目標を上回る2 pg/mL

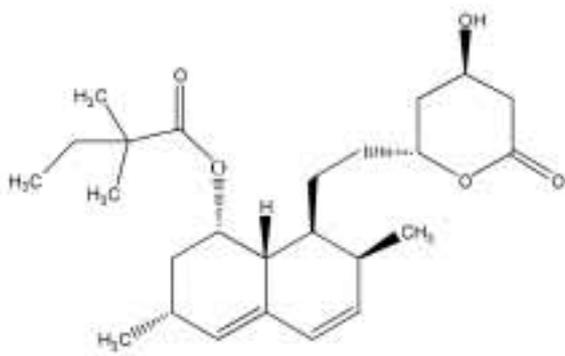


図3. Structure of simvastatin

のLLOQを確保する堅牢性の高い分析法を開発した。分析法バリデーションを実施後、MD臨床試験の測定を行い、定量値を得ることができた。

5. MDにおける今後の展望

海外でHot技術からMD臨床試験への試みが始まったことはすでに述べたとおりである。Hot技術はCold技術に比べ、選択性が高く、測定感度が高い。AMSにLCの分離技術を組み合わせることで、未変化体と代謝物を分けて測定することができるが、PETは未変化体と代謝物を分けることができない。また、Hot技術においては、開発化合物の放射線標識体を準備するための費用と時間が別に必要となる他、特別な施設・設備（いずれも国内普及台数は豊富でなく、医薬品開発に用いることのできる施設はさらに限定される）を用いる必要があるため試験実施費用が高くなる。Cold技術は、標識体を準備する必要はなく、LC/MSといった一般的な装置（国内普及台数は潤沢であり、医薬品開発に用いることのできる施設も多い）でも行えるため、Hot技術と比べ、試験実施費用は安価になる。しかしながら、代謝物測定などに特殊な技術が必要となる他、感度面でもHot技術には劣るため、データから得られる情報が少なくなるという欠点もある。また、日本は世界唯一の被爆国であることから、放射線に対する抵抗感が大きいいため、Hot技術の実施が進んでいないとも言われている。MD臨床試験におけるAMS、PETおよびLC/MS/MSの比較を表1にまとめた。

MD臨床試験を実施するメリットは、医薬品開発の成功率向上にあることは、すでに述べた通りである。MD臨床試験の実施は、通常の医薬品開発に開発費用や期間が追加されるといったデメリットがよく取り上げられる他、たったひとつのMD臨床試験のデータから開発のgo/no goを判断することは難しいため、MD臨床試験自体を否定する意見は、医薬品研究者から多く聞かれる。これに対し、MD臨床試験を推進する意見として、候補化合物のヒトデータを早期に取得することで、ヒトにおける薬物動態上の予測性が上がり、それにより医薬品開発の成功確率が高めることができるため、結果として、全社的に医薬品開発費用を抑えることができると主張する。しかし実際には、国内MDガイドラインが制定されて以来、国内で実際の医薬品開発においてMD臨床試験が実施されたのは、2013年11月時点で2試験だけである。しかしながら、MD臨床試験の全てにおいて興味が失われているというわけではない。とりわけ製薬会社から高い関心を得ているのが、PETイメージング技術を用いた開発医薬品のPOC評価である。また、MD臨床試験におけるヒト代謝物の確認にも注目度が高い。これは、医薬品開発におけるMD臨床試験そのものの実施以上に、ヒト試験において得られるデータの有用性をどう医薬品開発に活かすかといった視点で、MD臨床試験によってアプローチ可能となる新技術に注目が集まっていると考えることができる。典型的事例とし

表1. 医薬品開発における生体試料分析に用いられる主な測定技術

測定技術	使用用途	特長
液体クロマトグラフ質量分析計：LC/MS (Liquid chromatograph/mass spectrometry)	・未変化体及び代謝物の定量 ・代謝物検索	・高感度測定 ・Cold (放射線非標識) 技術 ・試験費用が比較的安価 ・試験実施施設は豊富
加速器質量分析計：AMS (Accelerator Mass Spectrometry)	・未変化体及び代謝物の定量 ・マスバランス試験	・超高感度測定 ・Hot (放射線標識) 技術 ・試験費用が高い ・試験実施施設は少ない
陽電子放射断層撮影法：PET (Positron Emission Tomography)	・体内イメージング ・受容体占有率測定 ・POC 評価	・非侵襲なイメージング ・Hot (放射線標識) 技術 ・試験費用が高い ・試験実施施設は少ない

て挙げられるのが、 ^{14}C 標識化合物の静脈投与による iv トレーサー技術である[16]。これは臨床用量の薬物を経口投与した被験者に ^{14}C 標識した薬物を静脈投与することにより、絶対的生物学的利用能を求める技術であり、その手法には MD から得られたノウハウが下地になっている。こうした MD 臨床試験そのものではなく、MD によって得られた成果やノウハウから実際の医薬品開発で用いられるような新技術を生み出されることに期待したい。

もうひとつの視点として、Position paper に定めるような 1 型 MD 臨床試験ではなく、より確実なヒト薬物動態データが期待できる 3 および 4 型といった臨床用量に近い試験の活用といった実用性が求められていると考えられる。極微量投与で実施される 1 型 MD 臨床試験では、ヒト薬物動態データが得られるインパクトは決して小さいわけではない。しかしながら、医薬品開発に求められている判断材料として十分とは言いきれない。ヒト臨床試験においてもっとも重要な POC 評価を的確に行える指標が医薬品開発には求められている。現在もっと注目度の高い指標としてバイオマーカーが挙げられる[17,18]。薬効や疾病そのものの状態を反映する生体内成分を観察することより、薬物投与試験における候補化合物の POC 評価を的確に行おうとする試みはすでに多くの試験において実施されている。そうした観点からも、1 型 MD 臨床試験よりも 3 および 4 型といった早期探索の臨床試験を従来の臨床試験に組み入れるといった MD の活用方法も考えられないだろうか。

まとめ

その後、NEDO プロジェクトの成果は大きく評価され、国内における議論は一気に高まった。中でも注目を浴びたのが、LC/MS/MS による Cold 高感度化測定である。世界トップクラスともいわれる日本の高感度化測定技術によって、MD 臨床試験の実施が Cold でも十分可能であることを証明したという意味でも NEDO プロジェクトの意義は大きい。

今後、さらに MD において培われた高感度化測定技術が医薬品開発に大きく寄与することに期待したい。

引用文献

- [1] Paul, S. M.; Mytelka, D. S.; Dunwiddie, C. T.; Persinger, C. C.; Munos, B. H.; Lindborg, S. R.; Schacht, A. L. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2010**, 9, 203–214.
- [2] Kola, I.; Landis, J. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2004**, 3(8), 711–716.
- [3] Committee for Medical Products for Human Use, Position Paper on Non-clinical Safety Studies to Support Clinical Trials with a Single Microdose. EMEA, CPMP/SWP/2599/02/Rev 1 (2004).
- [4] FDA Guidance for Industry. Exploratory IND Studies. Guidance. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Washington DC, USA (2006).
- [5] 「マイクロドーズ臨床試験の実施に関するガイダンス」厚生労働省医薬食品局審査管理課長，薬食審査発第 0603001号，平成20年 6 月 3 日。
- [6] 「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」厚生労働省医薬食品局審査管理課長，薬食審査発0219第 4 号，平成22年 2 月19日。
- [7] Lappin, G.; Kuhn, W.; Jochemsen, R.; Kneer, J.; Chaudhary, A.; Oosterhuis, B.; Drijfhout, W. J.; Rowland, M.; Garner, R. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2006**, 80, 203–215.
- [8] European Microdosing AMS Partnership Program (EUMAPP), Outcomes from EUMAPP – A Study comparing in vitro, in silico, microdose and pharmacological dose pharmacokinetics, <http://www.eumapp.com/>, 2008.
- [9] 杉山雄一，山下伸二，池田敏彦，栗原千絵子。NEDO 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発 マイ

- クロドーズ臨床試験を活用した革新的創薬技術の開発. *News Letter*, **2009**, 2, 1–6.
- [10] Yamashita, S.; Masaoka, Y.; Kataoka, M.; Sakuma, S.; Suzuki, Y.; Imai, H.; Kotegawa, T.; Morimoto, T.; Ohashi, K.; Inano, A.; Sugiyama, Y. *24th JSSX Annual Meeting*, **2009**, Kyoto, Japan.
- [11] 森本卓哉, 山下伸二, 今井浩光, 須崎友紀, 稲野彰洋, 佐藤雄己, 伊東弘樹, 富樫一天, 牟田口国則, 野口隆之, 杉山雄一, 大橋京一. *第30回日本臨床薬理学会*, **2009**, 横浜, 日本.
- [12] Ikeda T.; Aoyama S.; Tozuka Z.; Nozawa K.; Hamabe Y.; Matsui T.; Kainuma M.; Hasegawa S.; Maeda K.; Sugiyama Y. *Eur J Pharm Sci.*, **2013**, 49, 4(16), 642–648.
- [13] Tozuka, Z.; Kusahara, H.; Nozawa, K.; Hamabe, Y.; Ikushima, I.; Ikeda, T.; Sugiyama, Y. *Clin Pharmacol Ther.* **2010**, 88(6), 824–830.
- [14] Shimizu, K.; Takashima, T.; Yamane, T.; Sasaki, M.; Kageyama, H.; Hashizume, Y.; Maeda, K.; Sugiyama, Y.; Watanabe, Y.; Senda, M. *Nucl Med Biol.*, **2012**, 39(6), 847–853.
- [15] Teshima, K.; Yoneyama, T.; Kondo, T. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2008**, 47, 4–5, 962–966.
- [16] Xu, X.; Dueker, S. R.; Christopher L. J.; Lohstroh, P. N.; Keung, C. F.; Cao, K.; Bonacorsi, S. J.; Cojocar, L.; Shen, J. X.; Humphreys, W. G.; Stouffer, B.; Arnold, M. E. *Bioanalysis*, **2012**, 4(15), 1855–1870.
- [17] 山口行治. *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)*, **2008**, 131, 435–440.
- [18] Gool, A. J.; Henry, B.; Sprengers, E. D. *Drug Discovery Today*, **2010**, 15, 3/4, 121–126.