

神戸学院大学

事業実施期間：開始 令和元年9月1日～終了 令和3年3月31日

申請者役職・氏名 薬学部・講師 入江 慶

研究・事業名

DBS法を用いた薬物血中濃度測定法の構築

交付申請内容

研究・事業の目的及び意義

本研究の目的は、Dried blood spot(DBS)法を用いて、血液1滴から薬物血中濃度を測定できる方法を構築し、本方法を用いた薬物血中濃度測定法を臨床研究に応用できるかを医療機関と連携し、検討することである。本方法の開発によって、臨床研究における薬物動態試験をより低侵襲かつ簡便に実施できるようになることが期待される。

DBS法は、微量の血液をろ紙に滴下し乾燥させ、試料を保管、運搬する方法である。近年、分析技術の進歩により、DBS中の微量な血液から薬物血中濃度を測定することが可能になり、免疫抑制剤や抗菌薬、抗がん剤など多くの薬物のDBS法を用いた測定法が報告されている。薬物動態試験では、正確なタイムスケジュールでマルチポイントの採血が必要な場合が多く、手技が簡便で、静脈採血に比べて侵襲の少ないDBS法は、薬物動態試験に有用である。また薬物によっては、乾燥させることによって保管中の安定性が高まり、試料を介した感染のリスクを低減できる利点もある。さらに通常は冷凍保管が必要な血漿や血清などと比較し、DBSは多くの場合、室温で保管できるため試料を郵送することもできる。また、血糖値測定のように自己採血でDBSを採取すれば、検体の採取場所や採血に必要な医療スタッフの制限を受けず、自宅や地域の薬局などで薬物動態試験を行うことも可能になる。このような背景から申請者は、非小細胞肺癌の治療に使用される分子標的薬であるゲフィチニブのDBS法を用いた測定法を開発しており、ゲフィチニブを服用中の患者を対象とした臨床研究を行い、DBS法を用いて血液1滴から簡便かつ低侵襲にゲフィチニブの血中濃度を測定できることを報告している¹⁾。

これまで多くの薬物のDBS法を用いた薬物血中濃度の測定法が報告されているが、実際にDBS法を用いて臨床研究を行った例は限られている。最近では、医薬品開発において国内

外で治験の薬物動態試験にもDBS法が利用されはじめているが、通常の静脈血採血で得た血液検体をろ紙に滴下するという方法で行っているなど、DBS法の利点を最大限に活用できているとは言い難い。

以上のように、DBS法を用いて血液1滴から薬物血中濃度を測定する技術は、臨床研究における薬物動態試験を実施する上で様々な利点があり、有用な方法であると考えられる一方で、臨床研究に広く活用できるほどには、普及しておらず、発展途上な技術であるといえる。そこで、本研究では、DBS法を用いた薬物血中濃度測定法を構築するとともに、本方法を用いた薬物濃度測定法が臨床研究に応用できるかを医療機関と連携し、検討することとした。

また、薬物代謝酵素やトランスポーターなどの遺伝子多型が薬物の体内動態に大きく影響することが知られている。DBSは、DNAを得るための試料としても利用でき、DBSから薬物血中濃度に加えて、遺伝子多型の情報が得られることができれば、薬物の体内動態を解析する上で有益である。そこで、本研究では、薬物血中濃度の測定で余ったDBSから遺伝子多型を測定できるかについても探索的に検討を行う。

【参考文献】

- 1) Irie K, et al., J Chromatogr B. 1087–1088, 1–5, 2018

研究・事業の方法及び手続

DBS法を用いた薬物血中濃度測定法の概略を下記に示す。血液1滴をろ紙に滴下し乾燥させ、DBSを得る。乾燥させたDBSから直径3mmの範囲をパンチアウトし、薬物を抽出し、液体クロマトグラフィータンデム型質量分析装置(LC-MS/MS)を用いて薬物血中濃度の測定を行う。また、薬物血中濃度の測定で余ったDBSの外側からDNAを抽出し、リアルタイム

PCRを用いて薬物代謝酵素などの遺伝子多型を測定できるかについても探索的に検討を行う。(図1)

1) DBS法を用いた薬物血中濃度測定法の構築

DBS法を用いた薬物濃度測定法は、過去に申請者が報告した方法をもとに、必要に応じて改良を加えて行う。対象は、分子標的薬剤(アペマシクリブ等)や免疫薬製剤(タクロリムス等)など臨床的に重要な疾患の治療薬であり、その薬物血中濃度が治療効果や副作用などと関連する可能性がある薬物とする。構築した測定法は、厚生労働省の発出する医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドラインやEuropean Bioanalysis Forumが発出するDBS法のバリデーションに関するホワイトレターなどを参考にバリデーションを行う。

2) DBS法を用いた遺伝子多型測定法の構築

DBSに含まれるDNAを抽出し、Taqman®プローブ(Applied Biosystems)を用いたリアルタイムPCR法によって、薬物代謝酵素の遺伝子多型の測定を行う。遺伝子多型は、対象とする薬剤の種類や日本人における変異割合などを考慮し、CYP3A5やCYP3A4などを検討する。また、薬物の種類によっては、薬物の排泄に関わるトランスポーター(P-gpやOATPなど)の遺伝子多型も測定することを計画している。

3) DBS法を用いた薬物動態試験(パイロットスタディ)

DBS法を用いて薬物血中濃度を測定する臨床研究のパイロットスタディを行う。構築した測定法を用いて、対象薬剤を服用中の患者を対象に指先などから自己採血により、DBSを採取し、血液1滴から薬物血中濃度が可能であることを実証する。この過程において、試料を採取する手技や患者の苦痛の程度、自己採血によって医療機関以外の場所で採血が可能かどうかなどについても検討し、標準化した薬物動態試験の手順を作成する。

この臨床研究は、神戸市立医療センター中央市民病院で行う。神戸学院大学と神戸市立医療センター中央市民病院は、教育・研究に関する連携協定を結んでおり、その活動の中でDBS法が実際に臨床研究に活用できるかを検討する。臨床研究の実施については、ヒトを対象とした医学研究に関する倫理指針を遵守し、研究計画書を作成した上で、神戸市立医療センター中央市民病院および神戸学院大学の倫理委員会の承認を得た上で実施し、試料の採取前にすべての患者から書面による同意を得る。

研究・事業の特徴(新規性、独自性等)

DBS法を用いて薬物動態試験を行った例は限られており、DBS法を用いた薬物血中濃度測定法を臨床研究に実用化するための意義のある研究である。また、遺伝子多型の情報を同時に得ることができれば、さらに本方法の適応範囲が拡大されることが考えられる。

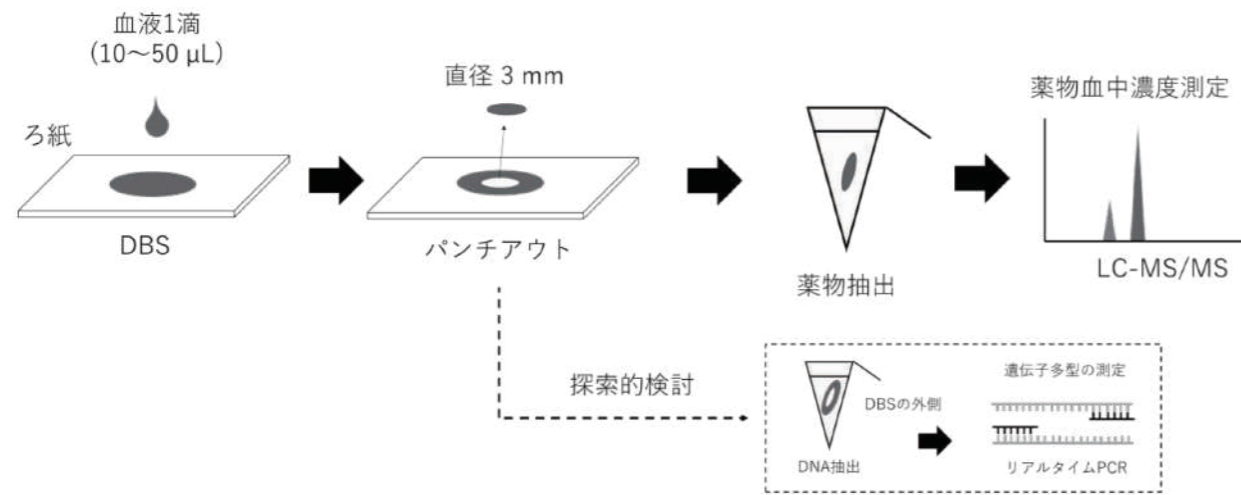
本研究は、神戸学院大学と神戸市立医療センター中央市民病院の大学-医療連携の中で行う研究であり、大学と医療機関が連携を図ることによって実現できる研究である。

研究・事業により期待される効果

DBS法を用いて薬物血中濃度測定法の構築により、医薬品の開発段階や実臨床における薬物動態試験をより低侵襲かつ簡便に実施できるようになることが期待される。将来的には、地域の薬局や在宅医療などで治療薬物モニタリング(TDM)にも活用できると考えられる。

これらのことにより、医薬品開発の薬物動態試験の侵襲性の低減や効率化、臨床現場における臨床研究によって、より安全で有効な個別化薬物治療の実現、将来的な薬剤師の職能拡大など、様々な効果が本研究から期待できる。

(図1)



DBS法を用いた薬物血中濃度測定法の概略

実績報告内容

研究・事業の方法及び手段

本研究では、図1に示す概略のようにDried blood spot (DBS)法を用いた薬物血中濃度測定法の構築を行った。血液1滴をろ紙に滴下し、乾燥させたDBSから直径3mmの範囲をパンチアウトし、薬物を抽出し、液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析装置(LC-MS/MS)を用いて薬物血中濃度の測定を行った。また、薬物血中濃度の測定で余ったDBSの外側からDNAを抽出し、リアルタイムPCRを用いて薬物代謝酵素などの遺伝子多型を測定できるかについても探索的に検討を行った。

研究・事業の内容及び目標達成状況

1) DBS法を用いた薬物血中濃度測定法の構築

当初の計画の通り、DBS法を用いた薬物血中濃度測定法の構築を行った。対象とする薬剤は、乳がんの治療に使用されるCDK4/6阻害薬であるアベマシクリブおよびバルボシクリブとし、液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)を用いて、測定条件の検討を行った。血液をろ紙に滴下し、アベマシクリブおよびバルボシクリブを含むDBSを作成し、DBS中からの抽出条件を検討した。抽出溶媒としてメタノールを用い、チューブミキサーを用いて安定した条件で抽出することにより、DBS中のアベマシクリブおよびバルボシクリブを短時間で精度よく定量できることが確認できた。

2) DBS法を用いた遺伝子多型測定法の構築

アベマシクリブは、p糖蛋白質の基質であることから、p糖蛋白質の活性に重要な一塩基多型(SNP)であるrs1045642をリアルタイムPCRを用いて、DBSの外側から抽出したDNAを用いて判定できることを確認した。

3) DBS法を用いた薬物動態試験(パイロットスタディ)

本方法を用いた臨床研究を神戸市立医療センター中央市民病院において開始するにあたり、アベマシクリブおよびバルボシクリブの薬物動態学的パラメータ(クリアランスや分布容積、AUCなど)を求めるために必要な採血時間を非線形混合効果モデルソフトウェアを用いてシミュレーションして検討を行った。少なくとも4-5ポイント以上の採血ポイントが必要であることがわかった。しかし、本方法を用いた臨床研究を実施するには、まだ至っていない。

研究・事業により期待される効果/
神戸医療産業都市の発展に与える効果

当初予定していた通り、DBS法を用いてアベマシクリブおよびバルボシクリブの血中濃度および遺伝子多型測定法を構築し、薬物動態試験をより低侵襲かつ簡便に実施できるようになったと考えられる。DBS法を用いたアベマシクリブおよびバルボシクリブの測定法は、通常の血液検体を用いた方法に比べ、少ない侵襲で簡便に血中濃度を測定できることから、マルチポイントの採血を必要とする薬物動態研究を行うために優れている。アベマシクリブやバルボシクリブは、乳がんの治療に使用される分子標的薬であるが、副作用として、重篤な好中球減少や下痢などが発現し、治療を中断、中止されることも多く、今後、本研究で構築した薬物濃度測定法や遺伝子多型の同時測定法を用いて、これら副作用と薬物濃度や遺伝子多型との関係を明らかにすることができれば、個々の患者に適した投与設計の提案が可能になると期待される。

今後の展開

DBS法を用いたアベマシクリブおよびバルボシクリブの測定法は、これまでに報告されておらず、本助成事業の成果として、今後、論文投稿を予定している。また、新型コロナウイルス感染症の拡大で開始が遅れているが、神戸市立医療センター中央市民病院との共同研究において、乳がん患者と対象として、本方法を用いた臨床研究を実施する予定である。