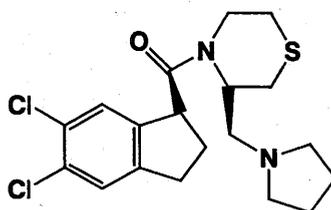


氏名	こばやし のぶ ひろ 小林 信 博
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第 641 号
学位授与の日付	平成 13 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	液体クロマトグラフィー・質量分析法を用いる低分子量薬物の新規リアルタイム分析およびペプチド性医薬品のインビトロ代謝に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 中川 照 眞    教授 半田 哲 郎    教授 佐治 英 郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

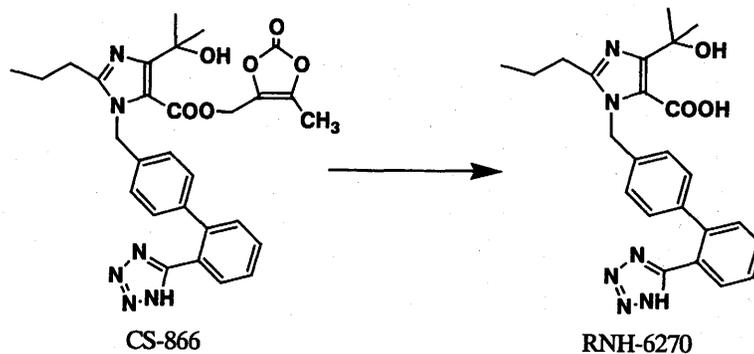


R-84760

新規カッパ選択的オピオイド受容体作動薬である R-84760 は、薬理活性が極めて高いため、その体内動態研究には、超微量分析が必要となる。そこで本研究では、先ず LC-MS/MS を用いた新規超微量定量分析法を開発した。本法は、夾雑物による妨害を全く受けず、R-84760 に対する選択性が極めて高いので、5 pg/mL の血漿中濃度の定量が可能であり、従って臨床試料の分析法としても十分適用できるものであった。本法を用いて、皮下投与後の各種実験動物の血漿中薬物濃度推移を測定し、その結果からヒトの血漿中薬物濃度推移を予測した。この予測結果は、臨床試験の設計に有用な情報を与え、実際の臨床試料の分析結果と良く一致した。

次に、R-84760 のラット血中濃度を直接かつ連続的に測定できるマイクロ透析 (MD) と直結したタンデム質量分析システム (MD-MS/MS) を構築した。従来のオンライン MD-MS/MS 分析法では、MS/MS への試料導入前に切替バルブを設け、還流液をループに蓄積する手法を取っていたため、分析間隔が分単位と長く断続的であった。これに対して、本法では、MD によって抽出された測定薬物を直接イオン源に導入するとにより、測定時間の間隔を大幅に短縮 (0.5 秒から数秒) することが可能となり、精密な濃度推移が測定できた。さらに、MD の還流液としてエタノール等の有機溶媒を 10~20  $\mu$  l/min の流速で用いることにより、MD における回収率向上および不揮発性妨害物質の混入が軽減され、安定した測定が可能となった。本システムの検量線作成時による直線性および日内変動試験による再現性を、R-84760 を添加した生理食塩水あるいはラット全血液中に MD を挿入して調べたところ、いずれも良好な結果が得られた。また、MD では血中遊離型薬物のみを測定できるため、R-84760 のタンパク結合率も算出することができた。R-84760 をラットに静脈内投与後の血中薬物濃度を本法で測定した結果、モデル解析で算出されるようなプロファイルが、投与後 1 時間まで実測定で得ることができた。

本研究で開発した MD-MS/MS 法を、in vivo だけでなく in vitro 試料に対しても適用した。アンジオテンシン拮抗阻害薬である CS-866 は、エステル分解酵素により活性本体である RNH-6270 に変換されて降圧作用を発揮するが、その変換速度が極めて大きいため、既存の分析法では速度の解析が困難である。そこで、各種マトリックス中における CS-866 のインビトロ加水分解反応速度を、本 MD-MS/MS 法を用いて測定した。その結果、CS-866 のラットおよびヒト血漿中、およびラット肝ミクロソーム中における半減期は 5.8 分、1.6 分、および 2.2 分であることが分かった。



サケカルシトニン (sCT) は、ヒトカルシトニン (hCT) と比較して生理活性が強いことが知られており、骨粗しょう症の治療薬として用いられている。sCT の活性が強い原因は、受容体に対する親和性の違いや hCT の凝集化による活性の低下によるものであるとされているが、代謝速度の違いに着目した研究は行われていない。また、主代謝臓器中におけるペプチド性医薬品の代謝物の構造を解析した報告もされていない。そこで、sCT と hCT の主代謝臓器である肝臓および腎臓の細胞内分解における代謝速度および代謝部位について、LC-MS 及び LC-MS/MS を用いて研究した。

まず、LC-MS による血漿中 hCT 濃度定量法を開発した。固定化抗体カラムで前処理し、hCT とアミノ酸配列が非常に近いラットカルシトニンを内部標準として用いた。これにより、血漿中濃度にして 5 ng/mL、絶対量にして 150 fmole の高感度分析法が可能となった。

次に、ラット肝及び腎のライソゾームとサイトソールを用いて、hCT および sCT の *in vitro* 代謝を調べた。消失速度に関しては、いずれの臓器の細胞画分においても hCT の方が sCT より速いことを見出した。hCT の代謝物に関しては、エンドプロテアーゼによる特定の位置での切断、およびその後にエキソプロテアーゼによる切断を受けたと考えられるペプチドが多数検出された。特に 10 Gly と 11 Thr 間およびその前後の配列部分が切断された代謝物が強く観察されており、hCT の代謝に大きく関与する部位であることが示唆された。精製プロテアーゼ中では、hCT は広範な加水分解を受けるのに対し、sCT は特定の部分の分解のみが観察された。以上より、sCT と hCT の代謝速度および代謝部位に関する差が薬理作用に寄与する可能性を示唆するとともに、hCT の代謝抵抗性を高める目的での修飾に対して有用な情報が得られた。

以上、低分子薬物およびペプチド性高分子薬物の代謝および動態解析の研究において、新規に開発した LC-MS、LC-MS/MS および MD-MS/MS 分析法の有用性を明らかにすることができた。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、現在急速に普及している ESI および四重極型 MS/MS 装置を用いて、薬物動態への応用研究の成果をまとめたものである。前半は、生体成分中低分子量薬物の LC-MS/MS および新規 MD-MS/MS 法による定量法の開発、後半はペプチド性ホルモンであるカルシトニンの LC-MS 定量法の開発、および *in vitro* 代謝に関するものである。

低分子量薬物の定量法については、カッパ選択的オピオイド受容体作動薬である R-84760 の LC-MS/MS を用いた新規超微量定量分析法を開発した。本法は R-84760 に対する高い選択性を有しており、5 pg/mL の血漿中濃度の定量が可能であった。本法を用いて、皮下投与後の各種実験動物の血漿中薬物濃度推移を測定し、その結果からヒトの血漿中薬物濃度推移を予測した。この予測結果は、臨床試験の設計に有用な情報を与え、実際の臨床試料の分析結果と良く一致した。

続いて、著者は上述の LC-MS/MS 分析を基に、生体成分中の薬物濃度を直接かつ連続的に測定できる、マイクロ透析 (MD) と直結したタンデム質量分析システム (MD-MS/MS) を構築した。本法では、MD によって抽出された測定薬物を直接イオン源に導入することにより、測定時間の間隔を大幅に短縮 (0.5秒から数秒) することが可能となり、精密な濃度推移が測定できた。R-84760 をラットに静脈内投与後の血中薬物濃度を本法で測定した結果、モデル解析で算出されるようなプロファイルが、投与後 1 時間まで実測定で得ることができた。また、アンジオテンシン拮抗阻害薬である CS-866 のラットおよびヒトの血漿などにおける非常に速い *in vitro* 加水分解反応を MD-MS/MS 法で測定したところ、加水分解速

度を正確に求めることができた。

LC-MSによる血漿中ヒトカルシトニン (*h*CT) 濃度定量法については、固定化抗体カラムで前処理し、ラットカルシトニンを内部標準として用いることにより、血漿中濃度にして5 ng/mL、絶対量にして150 fmoleの高感度分析法が可能となった。

カルシトニンの *in vitro* 代謝は、*h*CTより生理活性が強いことが知られているサケカルシトニン (*s*CTと*h*CTについて、主代謝臓器である肝臓および腎臓の細胞下画分における代謝速度および代謝部位を、LC-MS及びLC-MS/MSを用いて研究した。消失速度に関しては、いずれの臓器の細胞画分においても*h*CTの方が*s*CTより速いことを見出した。*h*CTの代謝物に関しては、エンドプロテアーゼによる特定の位置での切断、およびその後にエキソプロテアーゼによる切断を受けたと考えられるペプチドが多数検出された。特に10 Glyと11 Thr間およびその前後の配列部分が切断された代謝物が強く観察されており、*h*CTの代謝に大きく関与する部位であることが示唆された。精製プロテアーゼ中では、*h*CTは広範な加水分解を受けるのに対し、*s*CTは特定の部分の分解のみが観察された。以上より、*s*CTと*h*CTの代謝速度および代謝部位に関する差が薬理作用に寄与する可能性を示唆するとともに、*h*CTの代謝抵抗性を高める目的での修飾に対して有用な情報が得られた。

以上、本研究の成果は低分子薬物およびペプチド性高分子薬物の代謝および動態解析評価に新しい方法を提供するものであり、今後の医薬品開発において役立つものと考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値のあるものと認める。

さらに、平成12年12月12日論文内容とそれに関連した事項について諮問を行なった結果合格と認定した。