

氏 名	おお かわ とも ゆき 大 川 友 之
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 691 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	質 量 分 析 法 を 用 い る 薬 物 動 態 及 び 代 謝 安 定 性 の 迅 速 評 価 法 の 開 発

論文調査委員 (主査)
教授 中川 照真 教授 半田 哲郎 教授 橋田 充

論 文 内 容 の 要 旨

合成技術の進歩に伴い、医薬品候補化合物の数は激増しており、*in vitro*での活性を有する化合物も数多く見出されている。それら全ての化合物の*in vivo*薬効試験を実施することは困難であり、それらを効率よく評価し、薬効試験に供する化合物を選別する必要がある。そのためには、様々な迅速評価システムを構築する必要がある。それらの評価の中でも*in vivo*での薬効発現に特に重要である薬物動態評価、代謝安定性評価に関して、LC/MSあるいはLC/MS/MSを用いた迅速化法の開発研究を行った。また、安全性評価の一環として、薬物蛋白複合体のLC/MS/MSを用いた迅速な構造解析法についても研究を行った。また、これらの評価の迅速化の要件として、多くの薬物に適用可能な汎用性が最重要であるため、化合物に依存しない評価システムの構築を試みた。

第1章 質量分析法を用いた迅速薬物動態スクリーニング法

薬物動態スクリーニングの迅速化法としてカセットドージング法が知られている。この方法は、複数の薬物を同一の個体に同時に投与し、薬物濃度を同時に測定することによって薬物動態評価を迅速化するものであり、そのためには高感度・高選択性を有するLC/MS/MSによる分析が必須である。カセットドージング試験の迅速化においてはLC/MS/MSにおけるHPLC条件の最適化が律速段階となっているので、これを迅速化するために汎用性の高い分析システムの構築を試みた。その結果、極めて多種類の化合物に対して数時間以内でHPLC条件を最適化できるカラムスイッチングシステムを開発した。このシステムの再現性および正確さを200以上の化合物のカセットドージング試験において検証した結果、180以上の化合物に対して、定量下限を10 ng/mL以下に設定できること、内部標準なしでも良好な再現性が得られること、また安定して±20%以内の真度が得られることが確認され、カセットドージング法を用いた初期薬物動態スクリーニングにおいて極めて有用性の高い分析システムであることが明らかとなった。さらに、この分析システムでは、PEGなどの薬物投与媒体に由来するMSイオン化抑制はほとんど認められないことから、安定した高感度が得られること、投与媒体の選択肢が増えるなどの利点も併せ持つことが分かった。また、本システムをさらに最適化することにより、高分離が必要とされる代謝物の一斉分析にも適用可能となった。

第2章 質量分析法を用いた代謝物の構造決定法

代謝安定性評価においては、生成される代謝物の構造を迅速に決定し、代謝安定化を目的とした薬物分子の構造修飾のための情報を得ることが重要である。LC/MSあるいはLC/MS/MSを用いた代謝物の構造決定は広く普及しているが、従来はLC/MS/MSでのフラグメンテーションから構造を推定あるいは決定するため、酸素原子導入位置などの代謝部位の特定が非常に困難な場合も少なくない。そこで、代謝安定性評価の一環として薬物代謝物の構造決定法を開発した。従来のフラグメンテーションによる構造推定と並行して、HPLC移動相中の水の代わりに重水を用いて軽水素(H)一重水素(D)置換を観測することにより、代謝反応による酸素原子の導入形態がオキシドであるか水酸基であるかを区別することができ、導入位置を高い確立で推定できた。また、この手法においてセミマイクロカラムを備えたHPLCを用いることにより、使用する移動相量を大幅に削減することができ、セミマイクロカラムでもH-D置換が効率よく起こることを見出した。モデル化

化合物として用いた新規抗 HIV 薬として開発中である S-1153 の 7 種類の *in vitro* 代謝物の構造決定に本法を適用することにより、極めて迅速に 3 種類の代謝物の構造を決定でき、残り 4 種類の代謝物についても構造推定が可能であった。この方法は、代謝反応として最も一般的な酸素原子の導入の形態に関する情報を、親化合物の構造に依存せずを得ることができるという利点を有している。

第 3 章 質量分析法を用いた生体高分子薬物共有結合体の構造解析法

非ステロイド系抗炎症剤のアシルグルクロニドがヒト血清アルブミン (HSA) と共有結合複合体を形成することは広く知られており、免疫的な副作用の原因となる可能性が指摘されている。このことは、薬物蛋白共有結合体の生成が薬物の安全性に関与していることを示唆するものである。この問題を構造化学的に解明するためには、複合体中の蛋白質と薬物の結合位置および結合様式を迅速に決定することが必要となるが、従来は、複合体を酵素消化した後 LC/MS により分析を行ない、結合した薬物を含む消化断片を検索して結合位置を決定する方法が用いられた。しかし、この方法には、消化断片に対する選択性の高い検出方法が必須であるという欠点があった。

そこで化合物の特性に依存せず、迅速に結合位置を決定できる方法を考案した。すなわち、薬物結合前および結合後の蛋白質の酵素消化物を、LC/MS を用いて比較することにより薬物が結合した蛋白質に特異的に認められるペプチド断片を検出する方法であり、これにより化合物の構造や結合様式にかかわらず検出可能となった。本法をビリルビングルクロニドおよびグルクロン酸と HSA の共有結合位置の決定に応用した結果、ビリルビングルクロニドにより HSA の Lys190 が主に修飾されることおよび Lys525 にグルクロン酸が共有結合することを明らかにした。

以上述べたように、LC/MS (/MS) を用いることにより、カセットドージング法を用いた薬物動態評価における迅速定量法、薬物の代謝評価における H-D 置換を利用した代謝物の迅速構造決定法および薬物の安全性評価として今後重要になる薬物蛋白結合体の迅速構造決定法を構築することができた。これらの方法は、多くの薬物に普遍的に適用可能であり、医薬品開発初期段階の薬物動態研究において重要な知見を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

本論文は、質量分析法を用いることにより、*in vivo* での薬効発現に特に重要である薬物動態評価および代謝安定性評価を目的とした迅速かつ汎用性の高い分析法を構築したものである。

カセットドージング試験での血漿中濃度測定に、カラムスイッチング HPLC と MS/MS を接続したシステムを適用することにより、高い汎用性、高感度および高再現性を達成することができ、投与媒体の影響も除くことができた。このシステムの再現性および正確さを 200 以上の化合物のカセットドージング試験において検証した結果、180 以上の化合物に対して、定量下限を 10ng/mL 以下に設定できること、内部標準なしでも良好な再現性が得られること、また安定して $\pm 20\%$ 以内の真度が得られることが確認され、カセットドージング法を用いた初期薬物動態スクリーニングにおいて有用性の高い分析システムであることが分かった。さらに、この分析システムでは、PEG などの薬物投与媒体に由来する MS イオン化抑制はほとんど認められないことから、安定した高感度が得られること、投与媒体の選択肢が増えるなどの利点も併せ持つことが分かった。また、本システムをさらに最適化することにより、高分離が必要とされる代謝物の一斉分析にも適用可能となった。

従来のフラグメンテーションによる構造推定と並行して、HPLC 移動相中の水の代わりに重水を用いて軽水素 (H) - 重水素 (D) 置換を観測することにより、代謝反応による酸素原子の導入形態がオキシドであるが水酸基であるかを区別することができ、導入位置を高い確立で推定できた。また、この手法においてセミマイクロカラムを備えた HPLC を用いることにより、使用する移動相量を大幅に削減することができ、セミマイクロカラムでも H-D 置換が効率よく起こることを見出した。モデル化合物として用いた新規抗 HIV 薬として開発中である S-1153 の 7 種類の *in vitro* 代謝物の構造決定に本法を適用することにより、極めて迅速に 3 種類の代謝物の構造を決定でき、残り 4 種類の代謝物についても構造推定が可能であった。この方法は、代謝反応として最も一般的な酸素原子の導入の形態に関する情報を、親化合物の構造に依存せずを得ることができるという利点を有している。

薬物と蛋白質の共有結合複合体中の結合位置および結合様式を迅速に決定するために、薬物結合前および結合後の蛋白質

の酵素消化物を、LC/MS を用いて比較することにより薬物が結合した蛋白質に特異的に認められるペプチド断片を検出する方法を考案した。これにより化合物の構造や結合様式にかかわらず特異的な消化断片の検出が可能となった。本法をビリルビングルクロニドおよびグルクロン酸と HSA の共有結合位置の決定に応用した結果、ビリルビングルクロニドにより HSA の Lys190 が主に修飾されることおよび Lys525 にグルクロン酸が共有結合することを明らかにした。

以上、本研究は LC/MS (/MS) を用いることにより、カセットドージング法を用いた薬物動態評価における迅速定量法、薬物の代謝評価における H-D 置換を利用した代謝物の迅速構造決定法および薬物の安全性評価として今後重要になる薬物蛋白結合体の迅速構造決定法を構築したものであり、これらの方法は多くの薬物に普遍的に適用可能であることから、医薬品開発初期段階の薬物動態研究において重要な知見を与えることが期待できるものである。

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15年2月20日論文内容とそれに関連した事項につき諮問を行なった結果優秀と認定した。