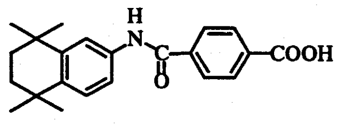
【729】

氏　　　名	伊藤雅司（いとう まさし）
学位(専攻分野)	博　士（薬　学）
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 666 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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	新規合成レチノイド系医薬品の免疫化学的測定法の開発と応用に関する研究
論 文 調 査 委 員	(主 査) 教 授 中 川 照 眞　教 授 佐 治 英 郎　教 授 冨 士　薫

論　文　内　容　の　要　旨

医薬品開発において，開発のステージと前臨床及び臨床各相の種々の試験の目的に応じた分析法を開発し，その分析結果から新たな開発の方針・戦略を速やかに展開していくことは非常に重要である。そこで，開発化合物である新規合成レチノイド Am-80（Fig. 1）を例にとり，医薬品開発の重要なポイントの一つである吸収・排泄等の体内動態に関する情報をいち早く入手するための分析法の構築に関する研究を行った。



4-[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)carbamoyl]benzoic acid

Fig.1 Chemical structure of Am-80(CAS 94497-51-5).

Am-80 は，成長促進，上皮細胞の分化，生殖作用等，強力なレチノイド作用を有する化合物であり，乾癬をはじめとする難治性の皮膚角化異常症の治療薬として，患部の皮膚に塗布することにより症状の改善が期待されている。しかし，レチノイド治療の最大の問題点は高ビタミン A 症と催奇形性であるため，血中への移行性ひいては全身に及ぼす影響の有無が非常に重要と考えられた。本薬物の血中濃度は非常に低く，その薬物動態を調べるためには高感度で特異性の高い測定法が必要となった。開発の各ステージにおける多数の被測定検体に対応できる能力を考慮すると，コアとなる測定法としてラジオイムノアッセイ（RIA）が適していると考えられた。

そこでまず RIA の構築に必要な抗体とラジオアイソトープ標識抗原を調製した。Am-80 のような低分子化合物に免疫原性を持たせるためには，適当なキャリアータンパクとコンジュゲートさせる必要があることから，特異的な抗体作製のため，3 種の免疫原を設計し，家兎に対して免疫を行って抗血清を作製した。ラジオアイソトープ標識抗原は，Am-80 を Lysine 誘導体とし，^{125}I-ボルトンハンター試薬を用いて作製した。得られた抗血清はその特異性及びアッセイのニーズによって最適なものを選択し，感度・特異性にすぐれた RIA 系を確立した。

確立した RIA 系を基にして，まず，Am-80 のイヌにおける 6 カ月反復経皮投与毒性試験において必要とされる薬物血中濃度測定を行うための分析法を開発した。イヌ血漿試料の測定については投与量が比較的多く被測定検体も多数であることから，ハイスループット迅速測定法として簡便な無抽出 RIA を設定した（定量限界：0.60 ng/mL）。本法により当該反復投与毒性試験で得られた血漿検体（計536検体）の迅速測定がはじめて可能となり，本薬物の経皮吸収・雌雄差，血中濃度の推移及び蓄積性に関して有用な情報が得られ，無毒性量の迅速設定に貢献できた。

次に，臨床相試料に適用するためにさらに高感度な測定法を開発した。薬物をヒトに投与するにあたっては，被験者の安全性を確保すると共にその薬物の体内動態を明らかにするため，血中濃度測定だけではなく，尿中・糞中の薬物排泄量を測

定することが極めて重要である。本薬物は投与量が極めて少量であり，かつ経皮投与であることから，高感度で特異性の高い固相抽出 HPLC-RIA を開発した（定量限界；血漿0.04 ng/mL，尿0.1 ng/mL，糞0.3 ng/mL）。臨床相試験（n=6）における血漿中濃度は，極めて低く推移し（採取した試料の80%以上が定量限界未満），また尿中にもほとんど排泄されないことが判明したが，全例で糞中への排泄が認められ，本薬物の吸収を確認することができた。さらに HPLC による優れた分離能と RIA による高感度検出及び抗血清の特異性（交差反応性）を利用し，Am-80 未変化体の他に数種類の代謝物を同時に定量することが可能となった。その結果，糞中には Am-80 未変化体に加えて代謝物も排泄されることが判明し，本薬物の排泄について従来得られなかった情報を得ることができた。

次に前処理の自動化について検討した。生体試料中の微量薬物の高感度分析を実施するにあたっては，抽出・濃縮等の前処理が必要となる場合が多い。抗体を固定化したカラム（イムノアフィニティーカラム，IAC）に生体試料を通すことにより，抗原抗体反応の高い特異性を利用して簡単な操作で分析対象物を抽出し，高度に精製・濃縮が可能となる。この方法は従来のバッチ式の前処理では困難であった省力化・自動化が比較的容易であることも大きな特徴である。本研究では，抗体を用いる Am-80 の分析効率の向上を目的として，IAC を用いた血漿試料の前処理法とその自動化システム（オンライン IAC-HPLC-RIA）を開発した（定量限界：0.50 ng/mL ヒト血漿）。本オンライン IAC-HPLC-RIA は，従来の（オフライン）固相抽出 HPLC-RIA とよく相関（相関係数；r=0.9974）し，煩雑な前処理操作の効率を改善できる極めて有効な方法であることが分かった。

以上，本研究では種々の免疫原を設計し，家兎に免疫して得られた抗 Am-80 抗体をその特異性および測定法の目的にあわせて選択し，医薬品の各開発ステージの必要性に応じた分析法を開発した。すなわち，前臨床試験では多数検体の迅速測定に適した無抽出ハイスループット RIA を，臨床相試験ではさらに高感度・高特異性の固相抽出 HPLC-RIA を開発し，Am-80 の迅速なステージアップに貢献した。一方，高分離能を持つ HPLC と併せ，交差反応性の異なる抗体を活用することによって代謝物の定量も可能となり，ヒトにおける本薬物の体内動態の研究に適用することができた。また，省力化の手段として，IAC を用いた自動化が実用可能であることが示され，医薬品分析のハイスループット化に貢献した。

論文審査の結果の要旨

新規開発医薬品の分析，特に生体試料中薬物の分析は，医薬品開発の各ステージで様々な目的で使用され，種々の判断の根拠データを提示する重要な役割を果たしている。その分析法の確立に当たっては，前臨床及び臨床各相のそれぞれの試験の目的に合致すると共に，医薬品開発全体を通して整合性のある一連の分析法を構築することが望まれる。著者は抗体を用いた免疫学的な分析法（イムノアッセイ）の広範な可能性に着目し，新規開発医薬品であるレチノイド系化合物 Am-80 について，特性の異なったいくつかの分析法の確立をめざして分析化学的な研究を行った。これらの分析法は本薬物開発時の生体試料分析に適用されると共に，その性質について詳細な比較検討が実施され，多くの興味ある知見が得られた。

イムノアッセイでは，抗体試薬と標識試薬によってその基本的な特性が決まるが，著者はこの二つの試薬の作製にあたって慎重に検討を行い，抗体を得るための免疫原として3種の異なったハプテン－キャリアータンパクコンジュゲートを設計した。また，標識剤として放射性ヨウ素を選択し，Am-80 を lysine 誘導体とした後に，^{125}I-ボルトンハンター試薬を用いて標識試薬を作製した。家兎から得られた各種抗血清とこの標識試薬を組み合わせて，ラジオイムノアッセイ（RIA）を設定し，その性質を比較検討したところ，ハプテンとキャリアータンパクを結合するハプテンの位置・構造とその架橋の有無によって，分析化学的に様々な特性を持つ抗体が得られることが明らかとなった。このようにして構築されたいくつかのアッセイ系の中から，感度・特異性について最適なものを選択することにより，多様な分析目的に応えられることが分かった。

続いて著者は，イヌを用いた非臨床試験（安全性試験）における多くのサンプルを測定するための簡便な無抽出 RIA 法を開発した。本法により，Am-80 の経皮吸収，血中濃度推移及び蓄積性に関する有用な情報を得ると共に，無毒性量の迅速設定を可能とした。これらの結果から，簡便性，多検体処理におけるイムノアッセイの有用性を明らかにした。

臨床相試験における薬物濃度測定では，非常に高感度で特異性の高い分析法が必要とされる。著者は固相抽出による前処理後 HPLC で分離し，薬物の溶出フラクションを RIA で測定する分析法を試み，血漿における定量限界が0.04 ng/mL である大変高感度な方法を確立した。本法を用いた臨床相試験血漿サンプル中の薬物濃度の測定では，大半のものが定量限界

未満であり，尿中にもほとんど排泄されないことが明らかとなったが，全例で糞中への排泄が認められ，本薬物の経皮吸収を確認することができた。さらにHPLCと併せ，交差反応性の異なる抗体を活用することによって未変化体以外に数種類の代謝物の同時定量を実現した。その結果，糞中には代謝物も排泄されることが判明し，本薬物の排泄について新規な知見を得ることができた。

さらに著者は分析効率向上のために前処理の自動化について検討し，抗体を固定化したカラム（イムノアフィニティーカラム，IAC）による血漿試料の自動前処理とRIAによる高感度検出を組み合せた系（オンラインIAC-HPLC-RIA）を開発した。IACによる前処理の自動化は分析の操作効率を改善できる極めて有効かつ実用的な方法であることを明らかにした。本法は応用範囲も広く医薬品分析のハイスループット化に貢献できることをした。

以上，著者は，(1)適切に設計された免疫原から得られた抗体，(2)その特性に合わせて構築したRIA,(3)高分離能を有するHPLC,(4)特異的な抽出を効率よく可能にするIAC，を開発しこれらの方法を組み合せる事により，試験目的の異なった多様な試料の分析を可能とした。また，イムノアッセイが薬物のヒトにおける（未知）代謝物の検索・推定から定量においても極めて有用であることを示した。本研究により，抗体を用いた分析法の可能性を一層広げることに貢献した。

よって，本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに平成14年1月10日，論文内容とそれに関連した事項につき諮問を行った結果優秀と認定した。