

博士学位論文

多品目の薬物血中濃度を院内定量するための
実用的な HPLC-UV プラットフォームの開発および
臨床応用に関する研究

**Studies on development and clinical applications of
a practical HPLC-UV platform for in-hospital quantification of
blood levels of multiple drugs**

東京薬科大学
2023 年度

森川 剛

目次

序論.....	1
第1章 多品目の薬物血中濃度測定のための実用的な HPLC 分析法の開発.....	9
1.1 緒言.....	9
1.2 方法.....	12
1.2.1 試薬.....	12
1.2.2 逆相 HPLC 分析.....	12
1.2.3 固相抽出による前処理.....	13
1.2.4 分析法バリデーション.....	13
1.3 結果.....	15
1.3.1 各薬物の逆相 HPLC/UV 検出条件の最適化.....	15
1.3.2 各薬物の SPE 前処理条件の最適化.....	16
1.3.3 血清中の各薬物の SPE 処理による回収効率.....	16
1.3.4 絶対検量線法による各薬物の血中濃度定量のバリデーション.....	18
1.4 考察.....	21
1.5 小括.....	23
第2章 TDM 対象薬の実用的な HPLC-UV プラットフォームの臨床的および定量的性能評価.....	24
2.1 緒言.....	24
2.2 方法.....	26
2.2.1 試薬・医薬品.....	26
2.2.2 患者血清.....	26
2.2.3 SPE カートリッジと SPE プロトコルの最適化.....	26
2.2.4 HPLC 装置と HPLC 条件の最適化.....	27
2.2.5 分析法バリデーション.....	28
2.2.6 LBA 法 (cobas) を用いた患者血清中の薬物濃度の定量.....	29
2.2.7 HPLC-MS/MS を用いた患者血清中の薬物濃度の定量.....	29

2.2.8 血清中薬物濃度の2種類の定量法間の一致度を分析する際に用いたデータプロット法.....	29
2.3 結果.....	30
2.3.1 前処理および HPLC 条件最適化後の HPLC-UV プラットフォーム.....	30
2.3.2 HPLC-UV プラットフォームを用いた本定量法のバリデーション.....	32
2.3.3 HPLC-UV と cobas および HPLC-UV と HPLC-MS/MS の相関性の評価.....	34
2.4 考察.....	37
2.5 小括.....	40
第3章 ファビピラビル血中濃度の院内での迅速な定量分析法の開発.....	41
3.1 緒言.....	41
3.2 方法.....	42
3.2.1 試薬.....	42
3.2.2 UV-VIS 分光分析.....	42
3.2.3 SPE および HPLC 分析用 FPV 試験液の調製.....	42
3.2.4 SPE カートリッジと前処理条件.....	42
3.2.5 HPLC 装置と分析条件.....	42
3.2.6 分析法バリデーション.....	43
3.2.7 患者検体の測定.....	43
3.2.8 金属イオンと FPV の複合体形成スクリーニング法.....	43
3.3 結果.....	45
3.3.1 HPLC 条件の最適化.....	45
3.3.2 SPE 条件の最適化.....	45
3.3.3 FPV 定量の最適化.....	46
3.3.4 分析法バリデーション.....	48
3.3.5 患者検体の測定.....	48
3.3.6 SPE カートリッジにキレートさせた各金属イオンに対する FPV の吸着割合.....	49
3.4 考察.....	50
3.5 小括.....	52

第4章 ファビピラビル血中濃度の上昇および低下の関連因子の探索研究	53
4.1 緒言	53
4.2 方法	55
4.2.1 患者	55
4.2.2 試薬	55
4.2.3 患者へのFPVの投与	55
4.2.4 血中FPV濃度の定量法	55
4.2.5 血中FPV濃度に影響を与える因子の探索	56
4.2.6 FPV投与前後の血清尿酸値の評価	56
4.2.7 統計解析	56
4.3 結果	58
4.3.1 COVID-19患者の背景とFPV投与後の血中FPV濃度	58
4.3.2 血中FPV濃度とフェリチン濃度の相関性	61
4.3.3 血中FPV濃度と尿酸値の相関性	63
4.4 考察	66
4.5 小括	68
総括	69
謝辞	74
主論文目録	75
引用文献	76

略語表

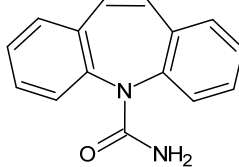
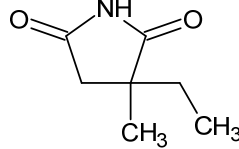
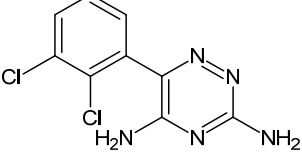
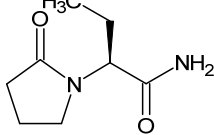
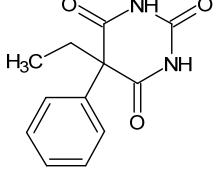
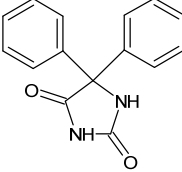
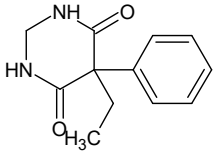
本学位論文では以下の略語を適宜使用した。

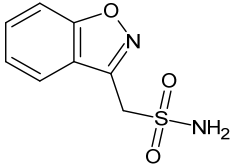
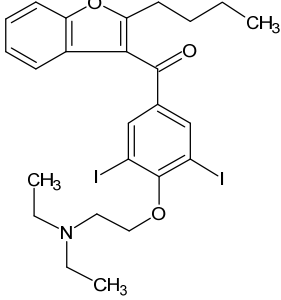
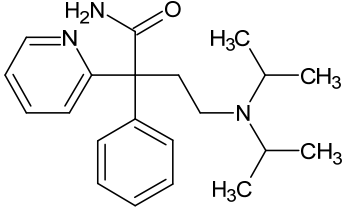
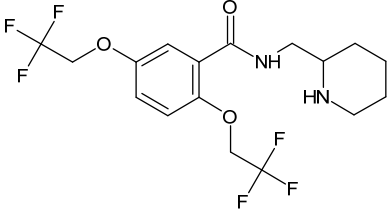
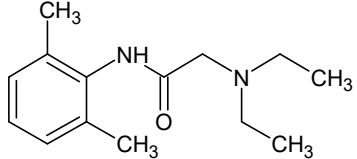
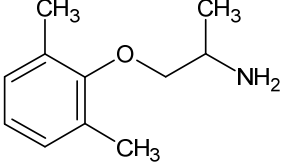
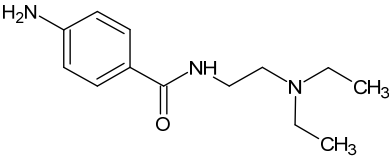
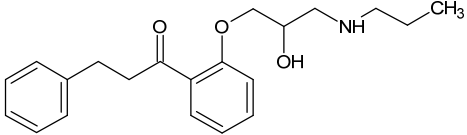
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
ANOVA	analysis of variance	分散分析
AO	aldehyde oxidase	アルデヒドオキシダーゼ
AUC	area under the curve	曲線下の面積
BMV	bioanalysis method validation	生体試料中薬物濃度分析法のバリデーション
CBZ	carbamazepine	カルバマゼピン
CRP	c-reactive protein	C反応性蛋白
ECLIA	electrochemiluminescence immunoassay	電気化学発光免疫法
eGFR	estimated glomerular filtration rate	推定糸球体濾過量
EIA	enzyme immunoassay	酵素免疫測定法
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
FPV	favipiravir	ファビピラビル
GC	gas chromatography	ガスクロマトグラフィー
HPLC	high-performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IQR	interquartile range	四分位範囲
IS	internal standard	内標準物質
LBA	ligand binding assay	リガンド結合法
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
LOA	limits of agreement	誤差の許容範囲
LOD	limit of detection	検出限界
LOQ	limit of quantitation	定量限界
LTG	lamotrigine	ラモトリギン
MEC	minimal effective concentration	最小有効濃度
MIPD	model informed precision dosing	
MS	mass spectrometry	質量分析計
MS/MS	tandem mass spectrometer	タンデム質量分析計
NHS	normal human serum	ヒト標準血清
ODS	octa decyl silyl	オクタデシルシリル基
PGx	pharmacogenomics	ファーマコゲノミクス
PHT	phenytoin	フェニトイン
PRC	partial regression coefficient	標準偏回帰係数
QC	quality control	品質管理
RIA	radioimmunoassay	放射免疫分析法

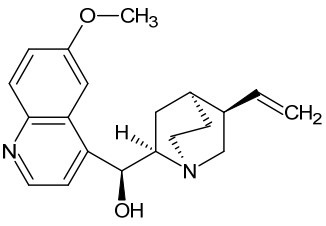
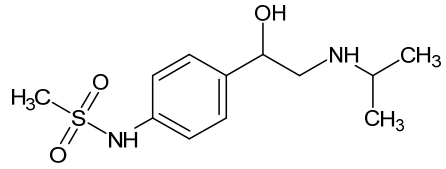
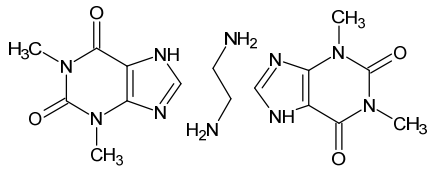
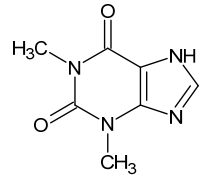
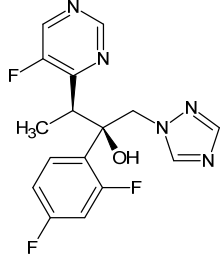
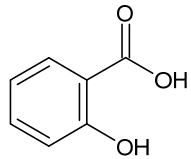
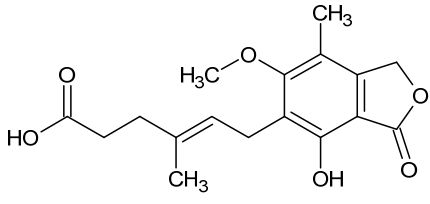
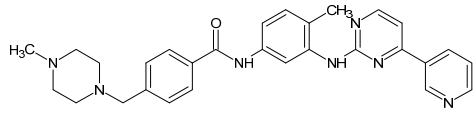
ROC	receiver operator characteristic 受信者動作特性
RP	reversed-phase 逆相
RSD	relative standard deviation 相対標準偏差
S/N 比	signal/noise ratio シグナル雑音比
SE	standard error 標準誤差
SPE	solid-phase extraction 固相抽出
SPRC	standardized partial regression coefficient 標準化回帰係数
SRM	standard reference material 標準物質
TDM	therapeutic drug monitoring 治療薬物モニタリング
TRFIA	time-resolved fluoroimmunoassay 時間分解蛍光免疫法
UV-VIS	ultraviolet-visible 紫外可視
VCM	vancomycin バンコマイシン
VIF	variance inflation factor 分散拡大要因
VRCZ	voriconazole ボリコナゾール
XO	xanthine oxidase キサンチンオキシダーゼ

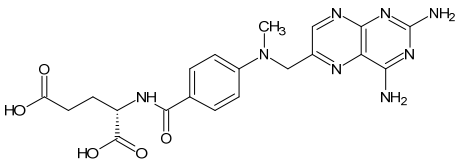
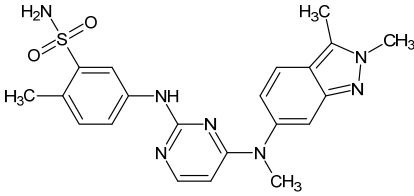
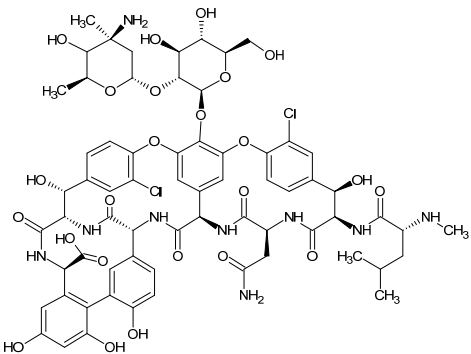
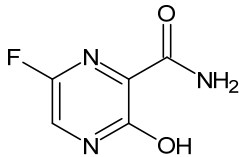
使用した薬物リスト

本学位論文では以下の薬物を使用した。

No	成分名	化学名	分子量	構造式
1	Carbamazepine	5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide	236.27	
2	Ethosuximide	(RS)-3-ethyl-3-methyl-pyrrolidine-2,5-dione	141.17	
3	Lamotrigine	6-(2,3-dichlorophenyl)-1,2,4-triazine-3,5-diamine	256.09	
4	Levetiracetam	(S)-2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)butanamide	170.21	
5	Phenobarbital	5-ethyl-5-phenylpyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione	232.24	
6	Phenytoin	5,5-diphenylimidazolidine-2,4-dione	252.27	
7	Primidone	5-ethyl-5-phenyl-2,3-dihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione	218.25	

8	Zonisamide	1,2-benzisoxazol-3-ylmethanesulfonamide	212.23	
9	Amiodarone	(2-{4-[(2-butyl-1-benzofuran-3-yl)carbonyl]-2,6-diiodophenoxy}ethyl)diethylamine	645.31	
10	Disopyramide	(RS)-4-(diisopropylamino)-2-phenyl-2-(pyridin-2-yl)butanamide	339.48	
11	Flecainide	(RS)-N-(piperidin-2-ylmethyl)-2,5-bis(2,2,2-trifluoroethoxy)benzamide	474.39	
12	Lidocaine	2-(diethylamino)-N-(2,6-dimethylphenyl)acetamide	234.34	
13	Mexiletine	2-(2-aminopropoxy)-1,3-dimethylbenzene	215.72	
14	Procainamide	4-amino-N-(2-diethylaminoethyl)benzamide	271.79	
15	Propafenone	1-{2-[2-hydroxy-3-(propylamino)propoxy]phenyl}-3-phenylpropan-1-one	341.44	

16	Quinidine	(9S)-6'-methoxycinchonan-9-ol	324.42	
17	Sotalol	(RS)-N-{4-[1-hydroxy-2-(propan-2-ylamino)ethyl]phenyl}methanesulfonamide	272.36	
18	Aminophylline	1,3-dimethyl-7H-purine-2,6-dione; ethane-1,2-diamine	420.43	
19	Theophylline	1,3-dimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione	180.16	
20	Voriconazole	(2R,3S)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(5-fluoropyrimidin-4-yl)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol	349.31	
21	Salicylic acid	2-hydroxybenzoic acid	138.12	
22	Mycophenolic acid	(4E)-6-(4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-1,3-dihydro-2-benzofuran-5-yl)-4-methylhex-4-enoic acid	320.34	
23	Imatinib	4-(4-methylpiperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-ylamino)phenyl]benzamide monomethanesulfonate	493.60	

24	Methotrexate	(S)-2-(4-(((2,4-diaminopteridin-6-yl)methyl)methylamino)benzamido)pentanedioic acid	454.44	
25	Pazopanib	5-[[4-[(2,3-Dimethyl-2H-indazol-6-yl)methylamino]-2-pyrimidinyl]amino]-2-methylbenzolsulfonamide	437.52	
26	Vancomycin	(1S,2R,18R,19R,22S,25R,28R,40S)-48- {[[(2S,3R,4S,5S,6R)- 3- {[[(2S,4S,5S,6S)- 4- amino- 5- hydroxy- 4,6- dimethyloxan- 2- yl]oxy}- 4,5- dihydroxy- 6- (hydroxymethyl)oxan- 2- yl]oxy}- 22- (carbamoylmethyl)- 5,15- dichloro- 2,18,32,35,37- pentahydroxy- 19- [(2R)- 4- methyl- 2- (methylamino)pentanamido]- 20,23,26,42,44- pentaoxo- 7,13- dioxo- 21,24,27,41,43- pentaazaocetacyclo[26.14.2.23.6.214,1 7.18,12.129,33.010,25.034,39]pentaconta- 3,5,8(48),9,11,14,16,29(45),30,32,34,3 6,38,46,49- pentadecaene- 40- carboxylic acid	1449.30	
27	Favipiravir	6-Fluoro-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide	157.10	

No. 1~25 : 第 1 章

No. 1, 3, 6, 20, 26 : 第 2 章

No. 27 : 第 3, 4 章

序論

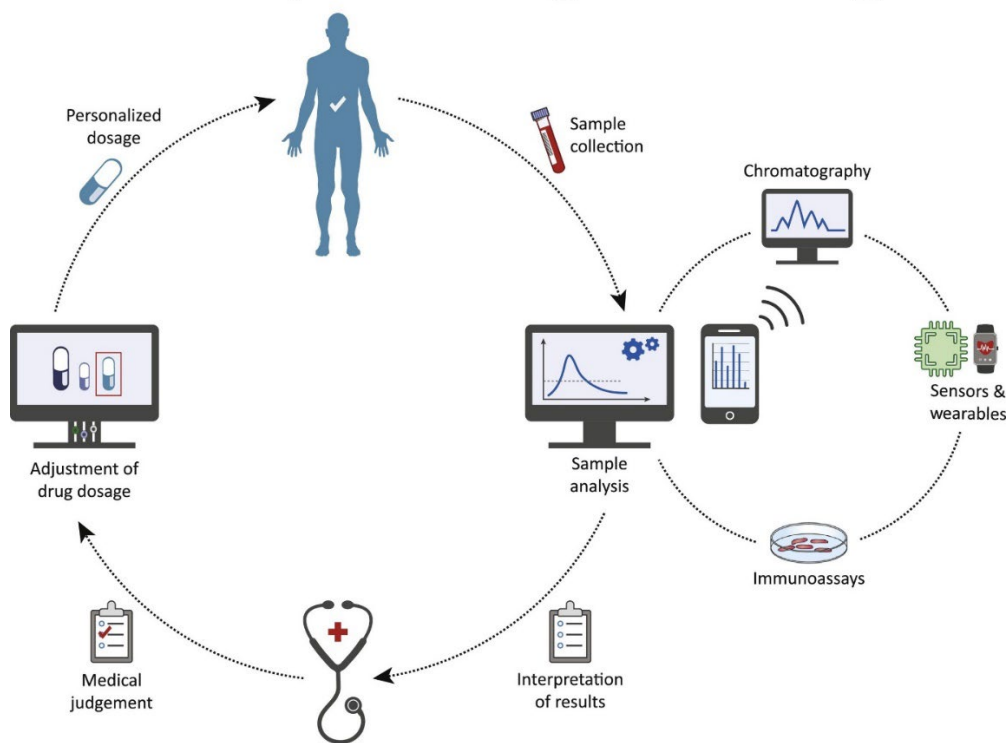
はじめに

著者は 2012 年に薬剤師として働き始め、治療薬物モニタリング (Therapeutic Drug Monitoring; TDM) を行う必要のある薬剤のうち、病院内で血中濃度を定量できる薬剤は一部であり、多くの薬剤の分析が外部委託されている状況を知ることとなった。例えば、著者所属の JA 長野厚生連北信総合病院 (以下、当院) では、臨床検査室内の生化学・免疫分析装置を用いて薬物血中濃度測定を行う項目は、汎用される 7 薬剤に限っており、他の約 40 薬剤は外部委託していた。外注は検査コストや人件費を削減でき、簡便に結果が得られる反面、分析結果を得るのに数日～1 週間程度かかり、委託費用も安くはない。しかしながら、それらの項目を院内で測定するために必要な検査装置の導入コストやランニングコストは市中病院には負担が大きく、さらに分析担当者の不在も相まって、院内での薬物血中濃度測定業務は、全国的にも縮小傾向にあった。このような現状に直面し著者は、より多くの薬物の血中濃度を院内で迅速に測定できる環境を創出し、薬剤師として個別化医療に貢献したいという想いを強くし、これが本研究の動機となった。

個別化医療

個別化医療は、一律に同一の治療を行うのではなく、個々の患者の体質や病態にあった有効かつ安全な治療の実現を目指している¹⁾。現在は、個人毎により最適な治療方法や予防方法を分析・選択・施行するプレジジョン・メディシン (precision medicine; 精密医療) という概念が、2015 年米国一般教書演説でオバマ大統領が発表したことによって広まっている^{2, 3)}。このプレジジョン・メディシンを支援する有効なツールとして、遺伝子情報に基づいた最適な薬物の選択や投与量設定を行うファーマコゲノミクス (pharmacogenomics; PGx) や薬物血中濃度測定と解析により最適な投与量・投与方法の設定を可能にする TDM が挙げられる⁴⁾。さらに近年は、個別の薬物や患者において構築されたモデルに基づく投与設計 (model informed precision dosing; MIPD) の重要性も高まっている^{5, 6)}。MIPD においてもまた、TDM がその妥当性の検証およびモデルの最適化に有用である。それぞれの概念に違いはあるものの、いずれも広義の個別化医療として考えると、薬物治療の最適化のために、薬物血中濃度データが不可欠である、という点は共通している (Fig. 1)⁷⁾。これらの事実を踏まえると、日本の多くの市中病院で多品目の血中濃度測定ができないことは、個別化医療を推進していく上でも、喫緊の課題であるように思われる。しかし、院内で利活用できる新しい薬物血中濃度測定法の開発が本当に必要なのだろうか。また、必要だと仮定して、いったいどのような測定法が望まれるだろうか。その検討へと進む前に、人類が薬の用法・用量をいかに探求してきたか振り返る必要がある。

Therapeutic drug monitoring



Trends in Biotechnology

Fig. 1 Overview of Therapeutic Drug Monitoring (TDM).

This figure was quoted from a document of reference 7.

薬と用法・用量の探求

古代から人類は病気に苦しめられ、薬とその用法・用量を探求してきた⁷⁻⁹⁾。古代における薬物治療の例としては、まずは古代メソポタミアのシュメールの粘土板（紀元前 3000 年頃）が挙げられる。この粘土板の中には、楔形文字で医薬品の処方記されたものがあり、世界初の薬剤処方集と考えられている。エジプト文明では、医学書「パピルス・エーベルス」（紀元前 1538 年頃）があり、薬の調合や呪術に基づく処方などが記されている。古代ギリシャ時代にヒポクラテスやガレノスらによる丹念な研究があったことは有名である。紀元前 3 世紀にはアリストテレスの弟子であるテオプラストスが「植物誌」（*De historia plantarum*）を著し、生薬学が発展を遂げる。ローマ時代の 1 世紀には、軍医ディオスコリデスが「薬物誌」（*De materia medica*）を著し、ここでは 600 種類の薬用動植物を命名し、それぞれの製造・貯蔵・鑑別・効能・用量などが詳しく記載され、その後 1500 年以上にも渡って利用された。ここで興味深い点は、古代ギリシャ時代や古代ローマ時代には既に、薬のリスクをいかに乗り越えるか、薬が毒物になるのをいかに防ぐかといった今日の薬学でも重要な問題が記されていることである。

7 世紀から 16 世紀まではイスラム世界の黄金期で、イスラム科学が先進的な発展を

遂げている。8世紀にアッバース朝のイラクで薬剤師（サイダリ）が出現すると、医薬品処方集の習得が薬剤師に課せられた⁹⁾。一方、西洋では、13世紀にシチリアの神聖ローマ帝国のフリードリヒ2世は、地中海における交易から多種多様な薬物の流入を背景に、特定の技術をもつ薬剤師にそれらを扱う特権を認め、今日の医薬分業の起源といわれる⁸⁾。このように中世において薬剤師という職業が確立してきたが、薬剤師という言葉は、医薬品の製造から供給、与薬までも行う人物を意味し、薬の用量の管理が重要であったことが推察される。医化学の祖パラケルスス（1495年～1541年）の言葉を借りれば、「全てのものは毒であり、毒でないものなど存在しない。その服用量こそが毒であるか、そうでないかを定める」であり、例えば、トリカブトはその毒性を狩猟や暗殺に使用された一方で、根を乾燥させたものは「附子」と呼ばれ、漢方薬にも用いられている。このように天然物質の毒性を知り、服用量を調整して薬に変えることは人類の叡智であり、まさに「毒薬変じて薬となる」である。

さて、19世紀までの何千年もの間、このような経験主義的な知識の蓄積によって薬は創造され、そして使用されてきたが、その後は体系的な合成技術によって工業化され、大量生産時代へと移行していく。日本においては、明治時代から薬剤師制度が始まり、当時の粗悪な薬品の輸入防止対策などを背景に製薬学校が創設された。1886年には日本薬局方が制定された。日本薬局方は現在も薬学におけるバイブルであるが、当時から薬毒物の分析は重要視されていた。例えば、東京薬学専門学校（現在の東京薬科大学）初代校長の丹波敬三は、東京帝国大学薬学科で裁判化学講座（現在の法化学や法中毒）を興し、法医学教室と連携して薬物検査を行っていた¹⁰⁾。

そして1932年、法医学目的に血中アルコール濃度の測定とその意義が初めて報告¹¹⁾されてから、血中薬物濃度測定の歴史が大きく動き始める。

個別化医療の芽生え～TDMの確立

1944年、抗マラリア薬キナクリンの血中濃度をモニターすることがその効果を評価する手段になることが報告されると、血中濃度測定が臨床への応用にも期待が高まった¹²⁾。その後、実際に臨床で利用されたのは、1960年のフェニトインの有効血中濃度範囲に関する研究であった¹³⁾。フェニトインを皮切りに1960年代からは薬物動態に関する研究が多く発表され、薬物動態学が確立されていく¹⁴⁾。1965年には、「薬物のモニタリング」の重要性について記述されたレビューが発表され¹⁵⁾、1970年代になるとTDMは薬剤の副作用に焦点を当て、毒性の発生率を減らし、治療範囲を決定する研究が散見されるようになる。

薬物血中濃度が治療効果と副作用発現に密接に関連するとき、TDMにおいて薬物血中濃度の把握が投与設計の指標となる^{16,17)}。無論すべての薬剤でTDMが必要という訳ではないが、TDMが必須もしくは有用な薬剤は多数存在する。1981年の診療報酬改定でTDMに関する「特定薬剤治療管理料」が新設されると、本邦においても多くの薬剤師が薬物血中濃度を測定し、投与量の適正化と個別化に寄与してきた。TDMの

実施が有用な薬剤を服用している患者において薬物治療が無効で、その血中濃度が有効治療域下限未満であれば投与量を増量し、一方で薬物治療は有効だがその血中濃度が副作用発現域であれば、投与量の減量を考慮する (Fig. 2)¹⁸⁾。他にも薬物血中濃度の測定は、患者の服薬アドヒアランスの判断を可能とし、多剤併用患者で薬物間相互作用の影響を検討する上などでも役立つ (Table 1)。

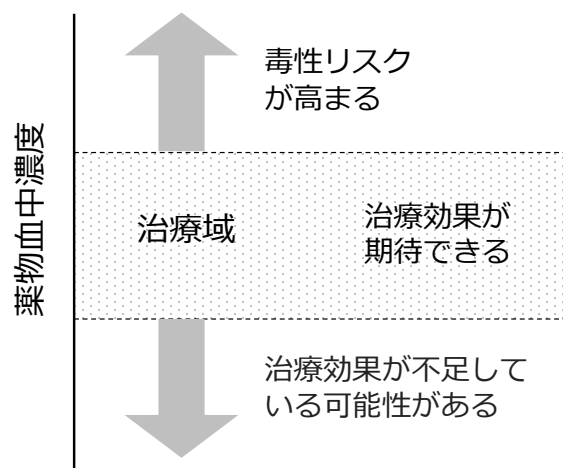


Fig. 2 Concept of the therapeutic range.

This figure was quoted and modified from a document of reference 18.

Table 1 Benefits of therapeutic drug monitoring (TDM).

利点	コメント
服薬不遵守の特定	治療効果に満たない濃度や高濃度は服薬不遵守である可能性がある。ただし、代謝活性が UM (Ultra-Rapid Metabolizer) で治療効果に満たない場合もある。
投与量の個別化	代謝や排泄が腎機能や肝機能などによって変化する薬剤がある。高齢者や小児、妊娠中の女性は TDM に基づく調整が必要になることがある。
有害事象や中毒の回避	TDM は副作用の予防や中毒の回避にも役立つ。
安全性の向上と入院期間の短縮	TDM は安全性に寄与し、入院期間を短縮するため、医療費の節約につながる。
治療無効の調査	患者が薬に反応しない場合、吸収が悪いのか、薬物代謝に遺伝的変異がある可能性があり、TDM はそのような患者を特定するために役立つ。治療範囲内の薬であっても、患者がその薬に反応しないことはある。

This table was quoted and modified from a document of reference 17.

定量分析技術の歴史

このような TDM 研究が勢いを増していった背景には、クロマトグラフィー法とリガンド結合法 (Ligand Binding Assay; LBA) の誕生と進化がある (Fig. 3)。まずクロマ

トグラフィー法について、現在のクロマトグラフィーは、マーティンとシングが 1941 年に液-液クロマトグラフィーを発明したことに始まる¹⁹⁾。その 10 年後にジェームズとマーティンが気-液分配クロマトグラフィー (Gas Chromatography; GC) を導入した²⁰⁾。当時急成長していた石油化学産業の需要があり GC は普及していくが、様々な薬物の血中濃度にもまた GC が用いられるようになった²¹⁾。1970 年代初頭になると製薬産業の需要から高速液体クロマトグラフィー (High-Performance Liquid Chromatography; HPLC) が主力分析機器へと躍進した (Fig. 3)。既知の化合物の 80% は GC による分離を行うには十分な揮発性をもたないが、LC はそうした化合物にも適応できた²¹⁾。本邦の医療現場における定量分析技術としては、紫外可視吸光検出器を備えた HPLC-UV 法が、1980 年代～90 年代に果たした役割は大きかった^{22,23)}。本邦の薬剤師も HPLC-UV 法を活用した TDM 研究を数多く行っている。その後は、質量分析法 (Mass Spectrometry; MS) やタンデム質量分析計 (Tandem mass spectrometer; MS/MS) が GC や HPLC との組み合わせとして発展し、臨床においても使用されるようになっていった。例えば、本邦の臨床薬毒物分析においては、1998 年に厚生省 (現在の厚生労働省) の補助によって、救急救命センターに主に HPLC-MS/MS や GC-MS が配備された²⁴⁾。このような時代の流れの中で HPLC-UV 装置を保有する医療機関は減少の一途を辿ることとなった。

クロマトグラフィーによる分離分析

移動相	固定相	分析法
気体	固体 ^{a)} ・液体 ^{b)}	ガスクロマトグラフィー (GC)
液体	固体 ^{c)} ・液体 ^{d)}	液体クロマトグラフィー (LC)

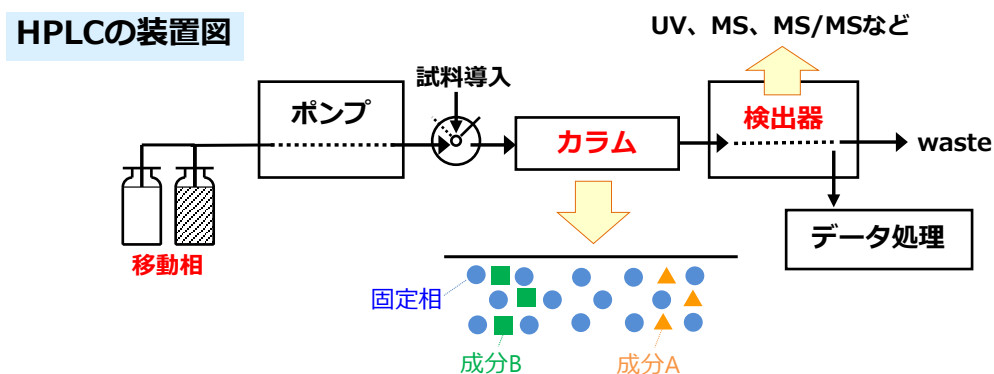


Fig. 3 Separation analysis by chromatography.

a) 気-固クロマトグラフィー (gas-solid chromatography; GSC), b) 気-液クロマトグラフィー (gas-liquid chromatography; GLC), c) 液-固クロマトグラフィー (liquid-solid chromatography; LSC), d) 液-液クロマトグラフィー (liquid-liquid chromatography; LLC)

もう一つの重要な分析技術として、イムノアッセイなどの LBA 法が挙げられる²⁵⁾。

1959年にヤローとバーソンが、ラジオイムノアッセイ（RIA）を用いて血中インスリン濃度を測定し、イムノアッセイの歴史は幕を開けた²⁶⁾。RIA法はアイソトープを用いるため特定の施設や廃棄設備が必要であるが、その後、酵素を標識とする酵素免疫測定法（Enzyme immunoassay; EIA）²⁷⁾などの技術が生まれ、高感度な自動分析装置として医療機関においても広く普及していった。

医療現場での血中濃度測定の実状

LBA法を搭載した簡易な自動分析装置の普及は、臨床検査の効率化を推進した。臨床検査で使用される自動分析装置は、TDM対象薬だけでなく、生化学項目の測定も可能とし、装置数の節約によりランニングコストの削減や省スペース化にも寄与する。しかし、LBA法の欠点としては、LC法より真度や精度が劣る点や試薬費が安い点、試薬がない項目は当然ながら測定できない点などが挙げられる。また、病院経営の観点から、使用頻度の低い検査項目は検査コスト削減のため外注へ切り替えることもあるだろう。

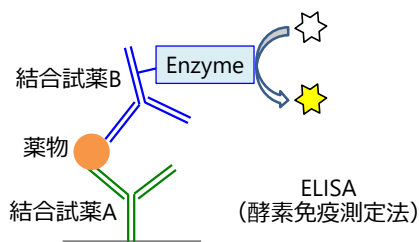
一方で、HPLCによる定量分析は、半自動化された連続分析が可能である。MSを検出器としたLC/MS法が普及しているが、導入コストと特殊な機器操作や維持管理の理由により、運用できる医療施設は限定される（Fig. 4）。

薬物血中濃度の定量分析法

リガンド結合法

(Ligand Binding Assay; LBA)

- 抗原抗体反応に基づく免疫学的測定法（イムノアッセイ）
- 簡便かつ迅速に測定可能
- HPLC法より真度や精度に劣る



クロマトグラフィー

(LC/MS法など)

- 分離分析法
- 選択性や信頼性の高い測定が可能
- 特殊な機器操作が必要
- 導入コストと維持管理

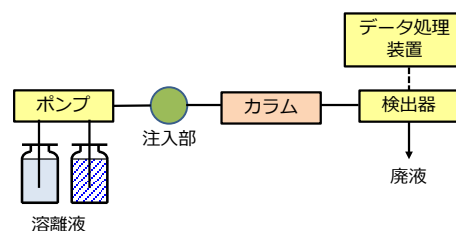


Fig. 4 Methods for quantitative analysis of drug blood concentrations.

日本病院薬剤師会が毎年行っている「病院薬剤部門の現状調査」の2021年6月の報告²⁸⁾によると、TDMを実施している施設は70.2%（2,332/3,320施設）で、そのうちTDMの測定を行っているのは、薬剤部門12.3%（287/2,332施設）、検査部門58.8%（1,372/2,332施設）、外注64.9%（1,513/2,332施設）であった（Table 2）。この調査に

において、病床規模が大きいほど TDM 実施割合が高く、TDM の測定においては薬剤部門で測定する割合は病床規模によらず 1 割程度と低く、その多くを検査部門や外注が担っていることが分かる。ただし、本アンケート調査では、TDM 業務の大まかな実態は把握できるが、TDM を実施している項目などの詳細は不明である。

Table 2 Survey of the current status of hospital pharmacy departments in 2021 (n=3,320, response rate 40.4%).

VIII. Therapeutic drug monitoring, 29. Measurement and analysis of TDM.

	病床規模					全体
	20～49	50～99	100～299	300～499	500 以上	
TDM の実施						
している	25.7%	49.1%	69.2%	87.7%	97.6%	70.2%
していない	68.1%	46.6%	26.6%	10.2%	2.1%	26.3%
TDM の測定						
薬剤部門	4.1%	12.5%	13.1%	9.2%	16.6%	12.3%
検査部門	28.6%	31.0%	49.3%	77.4%	81.5%	58.8%
外注	85.7%	75.6%	68.4%	57.6%	5.4%	64.9%
TDM の解析						
薬剤部門	71.4%	64.2%	77.9%	92.2%	95.7%	82.5%
検査部門	14.3%	11.1%	14.3%	9.4%	8.6%	11.8%
外注	34.7%	29.5%	22.8%	10.2%	5.8%	18.1%

This table was quoted and modified from a document of reference 28.

2018 年に実施された全国の特設機能病院、臨床研究中核病院、がんゲノム医療中核拠点病院またはがんゲノム医療連携病院（125 施設）を対象に行われたアンケート調査⁴⁾では、薬物血中濃度測定を行っている部署は、検査部（外注）が 79.3%（96/121 施設）、検査部（院内測定）が 77.7%（94/121 施設）、薬剤部（院内測定）が 33.9%（41/121 施設）、薬剤部（外注）が 13.2%（16/121 施設）であった。このアンケートでは TDM を実施している薬物についても調査しており、バンコマイシンについては 100%（121/121 施設）測定できているものの、ポリコナゾールは 82.6%、フェニトイン 80.2%、カルバマゼピン 76.0%、ラモトリギン 45.5%、アミオダロン 56.2%、ミコフェノール酸 45.5%、イマチニブ 33.9%などでは、特設機能病院などにおいても TDM の実施が不十分な実態が伺える。

一方、急性中毒時の薬毒物分析については、2017 年に本邦の救急現場の医師に対して全国調査が行われ、1999 年に日本中毒学会により提言された「分析が有用な中毒起因物質 15 品目」に関して、定量分析の結果が実際の患者管理に反映されているとは言い難い現況が報告されている²⁹⁾。二次救急医療施設 95 施設と三次救急医療機関 151 施設の計 246 施設のうち、MS を用いた薬毒物血中濃度分析を実施している施設は 22

施設（8.9%）のみであった。即日に定量結果が得られる項目は、テオフィリン（154 施設，62.6%），バルビツール酸系薬物（77 施設，31.3%），アセトアミノフェン（45 施設，18.3%）の 3 項目が 10%を超えており，それ以外の項目を測定できる施設は限られている。これは全国的な HPLC-MS/MS や GC-MS の導入から約 20 年経過して，残念ながらその維持管理が極めて困難である実態を示している。

本研究の目的

これまで個別化医療と定量分析法の歴史を振り返り，医療現場における薬物血中濃度測定の実状を見てきた。臨床現場での TDM や急性中毒時の薬毒物分析において，定量分析が必要であることは明白だが，その定量技術には迅速性・簡便性・経済性が求められ，一般病院の多くは血中濃度分析を外部委託し，分析業務を縮小している現状がある。LBA 法は検査項目の拡張性に劣り，HPLC-MS/MS や GC-MS は維持管理が困難な実態がある。しかし，そもそも薬物血中濃度は，刻一刻と変化する臨床所見や検査結果と併せてリアルタイムで考察することに臨床的な意味があり，迅速性を放棄することは本末転倒ではないだろうか。あるいは，迅速に薬物血中濃度を測定できないことでかえって臨床的な意義を見出せなくなっているかもしれない。臨床的な意義が低いと思われる検査項目を院内測定するために，設備投資と人件費をかける経営者はいない。しかしながら，TDM や急性中毒時の薬毒物分析は，目の前の患者の投与量の妥当性を科学的に検討する行為であり，これまで見てきたように薬学そして薬剤師の使命の一つであろう。そのため，この問題と向き合わずに放置し続けることは，医療の質の低下を招くだけでなく，薬剤師の自己喪失（identity crisis）にも繋がりがねない。

ここで著者は LBA 法や HPLC-MS/MS，GC-MS 法の欠点を補完する分析法として，改めて HPLC-UV 法の可能性を考えた。HPLC-UV 法は，確かに医療現場における利用は衰退しているが，今日においても分析初心者が扱いやすく安定性に優れた分析法であることもまた事実である。もし汎用性や簡便性，迅速性，検査項目の拡張性のあるプラットフォームを開発できれば，医療現場において HPLC-UV 法を再活用できるのではないだろうか。

以上より，本研究では，一般病院でも導入可能なコスト等を加味して，簡便な前処理と HPLC-UV 法を組み合わせた迅速な血中濃度定量分析法をプラットフォームとして構築した。第 1 章では本分析法の基礎的検討を行い，第 2 章では臨床研究として検証を実施した。さらに検査項目の拡張性に関する追加検討として，第 3 章では，COVID-19 の世界的流行のなかで治療候補薬であったファビピラビルの血中濃度測定法の開発を実施した。さらに，第 4 章では，実際に当院の患者検体を用いてファビピラビルの血中濃度を測定し，その変動因子について探索を行った。

第 1 章 多品目の薬物血中濃度定量を想定した実用的な HPLC 分析手順と装置の最適化

1.1 緒言

医療機関での薬物治療の実施に際して、使用する薬物の薬効と副作用の発現する濃度域が接近している場合や、効果発現域の個体差（患者間差）が大きい場合は、投与後の血中薬物濃度のモニタリング（TDM）を行い、患者個別に投与計画を最適化する必要がある^{16-17), 30)}。また、TDM を行うことが推奨される薬物治療においては、臨床所見だけでは治療効果や副作用発現の予測が困難な場合があり、病院等の医療機関内で迅速な TDM を実施することが有用である。

しかしながら、血液や生体試料中の微量な薬物を選択的に検出し、かつ精度良く定量するのは決して容易な技術ではない。この点に関して特に、医薬品開発段階の薬物動態研究における生体試料中薬物濃度分析法（バイオアナリシス）のバリデーション（bioanalysis method validation, BMV）に関するガイドラインが、日米欧でそれぞれ策定・発行されている³¹⁻³⁵⁾。例えば日本の BMV ガイドラインでは、バイオアナリシスのための分析手法として、「クロマトグラフィー（主に LC (or GC) /MS による手法）」^{31, 32)}と「リガンド結合法, ligand binding assay, LBA」³³⁾が採用され、手法別にガイドラインが分かれている。前者の LC 法は、分離分析法であるため妨害成分の影響を受けにくく、かつ薬物そのものを直接検出する定量法ゆえに、定量値の真度や精度が高いという利点があり、特に低分子薬物の定量に適している。一方、後者の LBA 法は、薬物（リガンド）に対して特異的に結合する結合試薬（抗体等）を利用して薬物を定量する手法であり、放射免疫法（RIA）、酵素免疫法（ELISA）、時間分解蛍光免疫法（TRFIA）、電気化学発光免疫法（ECLIA）などの総称である。LBA 法は間接定量法であるため、LC 法よりは真度や精度が劣り、生体試料中の妨害因子にも注意を払う必要があるが、分離操作が不要で多検体処理や迅速性に優れ、特に分子量の大きなペプチドや構造の不均一なタンパク質製剤などの定量に適している。

しかしながら、BMV ガイドラインは新薬開発時の臨床試験やトキシコキネティクス試験のための指針であり、医療現場での薬物治療時の TDM を想定して策定されたものではない。視点を変えると、医療現場での TDM に適用できる血中薬物濃度定量法は、迅速・簡便・経済的であることが特に重要であり、通常は BMV ガイドラインで保証されるような高レベルの分析精度は要求されない。

今日の医療現場における TDM の実施状況は、病院の規模や業務・経営状況に応じて様々である。しかし、自前の設備や人員で多少なりとも血中薬物濃度定量を十分に実施できる病院は決して多くはない^{4), 28-29)}。特に、BMV ガイドラインで主力の LC-MS/MS による定量は、高額で精密な装置の購入・運用・保守管理が可能な施設でしか行われていない²⁹⁾。一方、LBA 法については、臨床検査用の自動分析装置が TDM 用の薬物測定キットと共に各社から多数市販されている³⁶⁾。これらの装置は BMV ガイ

ドラインの策定以前に開発されたものであるが、半自動化されて操作性が良く、一般病院での日常的な TDM 業務用としての基本性能を備えている。しかしながら、機器本体のみならず試薬(抗体等)、消耗品、人件費等のランニングコストを加味した結果、実際は、血中濃度測定の大半の項目を院内測定ではなく外部委託して TDM を実施している施設が数多くある^{4), 28)}。外部委託分析は便利ではあるが、測定結果を臨床へフィードバックするまでに日数を要するため、TDM 実施の「迅速性」が損なわれてしまうのが大きな欠点である。このことは逆説的に、もし一般病院内でも多くの項目の測定が可能な簡便な血中濃度定量法が構築できれば、外部委託費用が抑制できるだけでなく、TDM で得られた定量値および薬物動態解析結果の迅速なフィードバックによって、より有効で安全な薬物治療が提供できることを意味している。

このような背景の元で、著者らは下記 1) ~ 4) を基本コンセプトとする院内測定用の実用的な血中薬物濃度定量法の開発に着手した。

- 1) 一般病院の臨床検査技師や薬剤師が日常業務として扱える手法であること。
- 2) 高額で特殊な装置や試薬を必要としないこと。
- 3) 多品目の薬物に対して適用可能であり、前処理も含めてほぼ同一の手順で行う手法であること。
- 4) 多検体処理を可能とする迅速性があり、将来的に半自動化が見込めること。

今回、上述の要件を満たす具体案として、紫外可視 (UV-Vis) 吸光検出器と ODS シリカカラムを備えた逆相分配 HPLC システムを採用した。しばしば、HPLC 分析はマニュアル操作が多く、初心者には扱いにくい専門的な装置と思われがちであるが、分析条件さえ決まれば半自動化された連続分析が可能となる。また、LBA 法と比べて定量値の真度や精度が高く抗体等の特殊試薬も不要であり、同一装置のままで分析対象(薬物)の種類を増やすことも容易である。TDM への HPLC 法の適用については、臨床的かつ経済的見地からその有用性や実用性を指摘する報告³⁷⁻³⁸⁾も見受けられ、今後の TDM 業務拡大のために期待されている分析法といえる。

また、HPLC 用サンプルの前処理には、ろ過や除タンパク、限外ろ過、液-液抽出、イオン交換、固相抽出 (solid-phase extraction, SPE) などがあるが、今回、SPE 法でシリカモノリスを用いたスピнкаラムを選択した。SPE 法は、試料のクリーンアップや濃縮のための技術として広く利用されており、固体の表面に化学的に有機官能基を結合している²¹⁾。例えば、オクタデシル基を結合したカラムは逆相分配相互作用を利用して疎水性の高い分析成分を抽出することができる。他にも極性の異なる様々な種類の固相が市販されている。また、スピнкаラムは、1) 遠心処理による簡単な操作、2) 高い通液性が得られ高速処理が可能、3) 少ない溶出量でも優れた再現性があること、4) 操作時間は 10 分以内に完了することから、臨床検体に用いるのに最適であり、本コンセプトに適合すると判断した。

このようにシリカモノリスを用いた前処理と分離分析を組み合わせるため、分析コストには注意が必要であるものの、多剤を服用している臨床検体においても高い選択

性が見込め、上記コンセプトを実現できると推察した。

このような考えに基づいて、2018年時点において、特定薬剤治療管理料1の算定が可能な薬剤（TDM対象薬）³⁹⁾について、前処理も含めてほぼ同一の手順でHPLCを行い、簡便・迅速に血中濃度を定量する手法を検討し、その適用範囲と性能について評価した。

1.2 方法

1.2.1 試薬

本研究の被検薬物として、2015年当時の特定薬剤治療管理料1の対象薬物群52品目（抗てんかん薬15品目）のうち、治療濃度範囲の最小値が0.1 µg/mL以上であり、UV吸収特性を有する薬物24品目と、上記管理料対象外の1品目（pazopanib）を選択した。このうち、flecainide, lamotrigine, methotrexate, phenobarbital, phenytoin, primidone, salicylic acid, sotalol については和光純薬工業から、aminophylline, amiodarone, carbamazepine, ethosuximide, imatinib, lidocaine, mexiletine, mycophenolic acid (mycophenolate mofetil の主要代謝物), propafenone, theophylline, voriconazole, zonisamide については東京化成工業から、levetiracetam についてはフナコシから、disopyramide, procainamid, equinidine についてはシグマ・アルドリッチジャパンから購入した。さらに経口分子標的抗がん剤のうち、最小有効濃度（MEC）が1 µg/mL以上でありUV吸収特性を有する薬物として、前出の imatinib と pazopanib（シグマ・アルドリッチジャパン）の2種類を選択した。

実験用の超純水は、Mili-Q Reference-A+（Millipore SAS, France）で製造したものを使用し、上記薬物の希釈液や後述のHPLC移動相溶液の調製用として、アセトニトリル（HPLC用、以下CH₃CNと略す）、1 mol/L 塩酸、塩化ナトリウム（以上、関東化学製）、及び酢酸アンモニウム三水和物（和光純薬工業製）を使用した。

また、ヒト標準血清として、和光純薬工業製の「液状コントロール血清 I ワコーC&C」を使用した。

1.2.2 逆相 HPLC 分析

本実験のHPLCシステムとして、日立ハイテックサイエンス製の高速液体クロマトグラフ Chromaster（装置構成：5310 カラムオープン、5210 オートサンプラー、5110 送液ポンプ、5430 ダイオードアレイ検出器）を使用した。分離カラムは、Merck 製の ODS モノリスカラムである Chromolith HighResolution RP-18 endcapped (100 mm×4.6 mm I.D.) に同 guard column (5 mm×4.6 mm I.D.) を接続して、逆相分配モードで使用した。移動相溶媒として、CH₃CN（A液）と10 mM 酢酸緩衝液（pH 5, B液）の二種類の溶液を送液ポンプ内で任意の割合で混合し、2.0 mL/min の流速でイソクラティック送液した。A液とB液の混合比率は、溶質の被検薬物が分離カラムを素通りせずかつ3分以内に溶出するように、薬物毎に検討・最適化した。試料溶液はスナップバイアル（0.3 mL 容、ジーエルサイエンス製）に入れて、オートサンプラーにて20 µL の一定量をHPLC装置に注入した。試料注入・分離後の溶出液の吸光度を200～400 nm の範囲でモニタリングし、薬物毎に設定した至適波長での吸光度値に基づいて、溶出ピーク面積の算出を行った。また、最適化条件でのHPLCクロマトグラムより、各薬物の保持係数（質量分布比： k' ）を次式より算出した。

$$k' = (t_R - t_0)/t_0$$

ここで、 t_R は薬物の保持時間（min）であり、 t_0 は硝酸カリウムの素通り時間（min）とした。

1.2.3 固相抽出による前処理

1.2.3.1 薬物標準溶液を用いる固相抽出手順

逆相 HPLC による薬物濃度定量に先立つ前処理手段として、SPE 法を検討した。SPE 用カラムには、ODS シリカモノリスディスクを媒体とする遠心用スピナーカートリッジである MonoSpin C18 (ジーエルサイエンス製) と、ODS 基とベンゼンスルホン酸基が共存する MonoSpin C18-CX (同) の二種類を使用した。MonoSpin C18-CX は、疎水性相互作用とイオン交換作用が働くため、塩基性薬物の分析に適している可能性を考慮して使用した。被検薬物は 50% CH₃CN 水溶液で 1 mg/mL に溶解してから、さらに超純水で 20 倍希釈して 50 µg/mL の標準溶液とした。

MonoSpin カートリッジへの通液は Eppendorf 製の 5415R 型卓上遠心分離機を用いて 5,000 rpm (2,300×g), 1 min の一定条件で行った。あらかじめ、CH₃CN 500 µL と水 500 µL を順次通液してコンディショニングした同カートリッジに、被検薬物の標準溶液 (50 µg/mL) 150 µL を通液して薬物を固相ディスクに吸着させた。次に、水 500 µL を通液して固相ディスクを洗浄した後、任意濃度の CH₃CN 水溶液 150 µL を通液して、薬物を溶出・回収した。さらに、回収した溶出液のうち 20 µL を 1.2.2 記載の逆相 HPLC 分析に供した。

この前処理過程において、被検薬物毎に、吸着させるカートリッジの種類と、溶出液の組成 (CH₃CN 濃度や塩濃度) の最適条件を検討・設定した。

1.2.3.2 薬物添加血清を用いる SPE 前処理手順

前項で最適化した SPE 条件を用いて、薬物添加血清の前処理回収実験を行った。臨床検体 (患者血清) モデルとして、前項の被検薬物溶液 (1 mg/mL) をヒト標準血清で希釈して、任意濃度の薬物添加血清を薬物毎に調製した。続いて、前項で薬物毎に最適化された SPE 条件に基づいて、各薬物添加血清 150 µL を MonoSpin カートリッジへ通液し、血清中の薬物を吸着・洗浄・溶出させてから逆相 HPLC 分析に供した。

1.2.4 定量バリデーション

1.2.4.1 血清からの薬物の回収率と定量下限値の算出

各薬物の標準溶液及び添加血清 (いずれも有効治療域内の最大濃度、もしくは 50 µg/mL) に対して、それぞれ 1.2.3.1 項及び 1.2.3.2 項記載の手順で SPE 処理と HPLC 分析を行い、両者の薬物ピーク面積比から、薬物添加血清からの SPE 回収率 (%、 $n=4$) と SPE ファクター値 (f : 回収率の逆数×100) を算出した。

また別途に、3 µg/mL の各薬物添加血清を調製し、SPE 処理後の HPLC クロマトグラム上の薬物ピークの signal/noise (S/N) 比より、各薬物の定量下限値 (µg/mL、S/N=5) を算出した。

1.2.4.2 絶対検量線法による分析法バリデーション

各薬物について、有効治療域内の 3 点 (最大、中間、最小) 濃度を決定し、各濃度の薬物標準溶液と薬物添加血清をそれぞれ調製した。その上でまず、薬物標準溶液を (SPE 処理を行わずに) 直接 HPLC に注入し、薬物濃度に対するピーク面積値のプロットより定量用の絶対検量線を作成

した。その際、3点濃度値を最小二乗法（1次関数）でフィッティングした3点検量線と、最大濃度値と原点を結んだ1点検量線の二種類を作成した。

次に、上述の3点濃度または任意濃度の薬物添加血清についてSPE処理とHPLC分析を行い、得られたピーク面積値に f 値（1.2.4.1を参照）を乗じてから、各検量線を用いて血中濃度値を算出し、繰り返し測定（ $n=4$ ）に基づく本法の分析法バリデーションを行った。具体的には、それぞれの検量線を用いた場合について、各薬物の3点濃度における真度（accuracy; %）と併行精度（repeatability; RSD%）を同一日内の定量値より評価し、さらに測定日の異なる三日間の定量値より室内再現精度（intermediate precision; RSD%）を評価した。

1.3 結果

1.3.1 各薬物の逆相 HPLC/UV 検出条件の最適化

本研究で構築した HPLC システムにおいて、薬物毎に最適化した分析条件（移動相中の CH₃CN 比率、UV 検出波長）と保持挙動（保持時間、*k'*）の一覧表を Table 1-1 に示した。各薬物の親疎水性の差異に応じて移動相中の CH₃CN 比率（%）が異なるが、すべての薬物に対して 3 分以内に保持・溶出できる移動相条件をそれぞれ決定することができた。具体例として、CH₃CN 比率が 25% で同一であった 7 品目の薬物について比較したクロマトグラムを Fig. 1-1 に示した。すべての薬物が素通りせずに保持されながら、3 分以内に溶出して検出できていることがわかる。なお、この条件では、7 品目中 5 品目の薬物の保持時間が 1.5 分前後（*k'* = 1 付近）でほぼ同時に溶出しているが、本研究では 1 薬物毎の定量分析を想定（多剤同時服薬の想定を除外）しているため、保持時間の接近するこれらの薬物を相互分離するための移動相組成や送液条件の検討は、今回行わなかったことを付記する。

Table 1-1 Optimized HPLC conditions and SPE conditions for medicinal drugs.

Medicinal drug ^{a)}		Optimized HPLC condition				Optimized SPE condition			
No.	Name	CH ₃ CN % in solvent	UV wavelength /nm	Retention time/min	<i>k'</i>	Cartridge type		CH ₃ CN % in eluate	NaCl mM in eluate
						C18	C18-CX		
1	carbamazepine	40	280	1.36	0.53	○	-	50	0
2	ethosuximide	10	205	2.59	2.50	×	×	-	-
3	lamotrigine	25	220	1.43	0.93	○	-	50	0
4	levetiracetam	10	205	1.40	0.89	×	×	-	-
5	phenobarbital	25	220	2.01	1.72	×	×	-	-
6	phenytoin	40	220	1.40	0.89	○	-	50	0
7	primidone	25	220	1.18	0.59	○	-	50	0
8	zonisamide	25	240	1.53	1.07	×	×	-	-
9	amiodarone	100	240	1.98	1.68	×	×	-	-
10	disopyramide	25	220	1.49	1.01	×	○	40	1000
11	flecainide	40	220	1.34	0.81	○	-	50	0
12	lidocaine	25	220	1.41	0.91	×	○	40	1000
13	mexiletine	25	210	1.52	1.05	×	○	40	1000
14	procainamide	10	280	1.12	0.26	×	○	20	1000
15	propafenone	40	220	1.58	1.14	○	-	50	0
16	quinidine	30	240	1.17	0.58	○	-	50	0
17	sotalol	10	220	1.29	0.74	×	○	20	1000
18	aminophylline	10	280	1.33	0.49	×	×	-	-
19	theophylline	10	280	1.32	0.48	×	×	-	-
20	voriconazole	40	260	1.77	0.99	○	-	50	0
21	salicylic acid	10	220	1.51	1.04	×	×	-	-
22	mycophenolic acid	40	220	1.45	0.96	○	-	50	0
23	imatinib	30	260	1.60	0.80	○	-	50	0
24	methotrexate	10	300	1.53	0.72	○	-	20	0
25	pazopanib	35	300	1.76	1.20	○	-	40	0

a) antiepileptic drug: No.1~8; antiarrhythmic drug: No.9~17; theophylline formulation: No.18&19; triazole antifungal agent: No.20; salicylic acid series: No.21; immune-suppressive agent: No.22; anticancer drug: No.23~25.

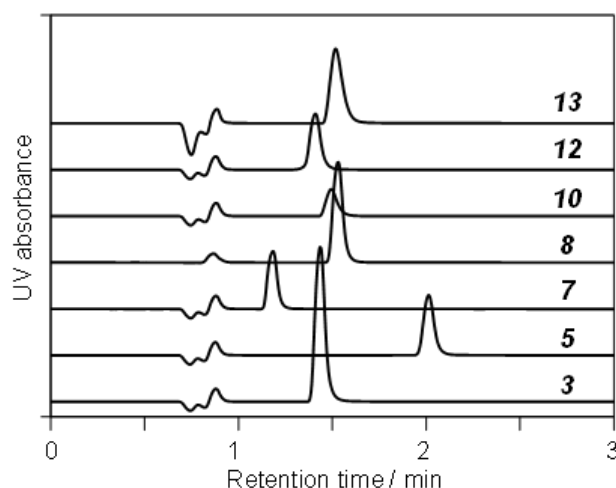


Fig. 1-1 Comparison of reversed-phase HPLC chromatograms of seven different drugs under a fixed mobile-phase condition at aqueous 25% CH₃CN (pH 5).

The number on each chromatogram corresponds to that of each drug shown in Tabel 1 ; No. 3, lamotrigine (detected at 220 nm) ; 5, phenobarbital (at 220 nm) ; 7, primidone (at 220 nm) ; 8, zonisamide (at 240 nm) ; 10, disopyramide (at 220 nm) ; 12, lidocaine (at 220 nm) ; 13, mexiletine (at 210 nm).

1.3.2 各薬物の SPE 前処理条件の最適化

25 品目の薬物の標準溶液を用いて、MonoSpin カートリッジによる SPE 処理の適用の可否と条件最適化を行った結果を（前項と同じ）Table 1-1 に併記して示した。まず始めに、すべての薬物に対して ODS 基を有する C18 カートリッジに通液したところ、吸着・洗浄（水）・溶出（含水 CH₃CN）の操作を経てほぼ 100%再回収できた薬物は、全 25 品目のうち 12 品目であった。次に、残りの薬物に対してカチオン交換基と ODS 基をミックスした C18-CX カートリッジを適用したところ、親水性の高い 5 品目の塩基性薬物については、吸着・洗浄後の溶出液（含水 CH₃CN）に 1 M（1000 mM）の NaCl 水溶液を加えることでほぼ 100%再回収できることを確認した。なお、この溶出液は、医療用の生理食塩水と CH₃CN の混液でも代替可能であることを別途確認している。

計 17 品目（12 品目 + 5 品目）の薬物に対する適切な SPE カートリッジの種類と、吸着・洗浄後の溶出液の最適組成（CH₃CN %と塩濃度）を Table 1-1 にまとめて示した。

1.3.3 血清中の各薬物の SPE 処理による回収効率

前項（1.3.2）の 17 品目の薬物についてそれぞれ任意濃度の薬物添加血清を調製し、前項にて最適化した条件でそれぞれ SPE 前処理を行い、血清からの各薬物の回収効率を比較検討した。血清への薬物添加濃度は、各薬物の有効治療域のほぼ最大濃度の値を設定して実験した。

Table 1-2 に示した通り、大半の薬物は（前項の標準溶液の場合と同様に）SPE 処理により血清中からも高い回収率（77~110%）で回収されており、繰り返し精度（RSD%, n = 4）も良好であった。これらの薬物では、Fig. 1-2 のクロマトグラムの事例（phenytoin (No.6) 添加血清の SPE 処理液）のように、各薬物の検出・定量を妨害する血清由来成分は認められなかった。

なお, Table 1-2 の薬物のうち, No.7 と 24 を除く 15 品目の薬物については回収率の再現性 (RSD%) が良好であったため, 1.2.4.1 項記載の式で SPE ファクター (f , 回収率が 100 % の時 $f = 1.00$ となる) をそれぞれ算出した.

また別途, 各薬物 3 $\mu\text{g/mL}$ 添加血清の SPE 処理後の HPLC クロマトグラムより各薬物の定量下限値 (LLOQ; $\mu\text{g/mL}$) を算出したところ, 0.10~1.48 $\mu\text{g/mL}$ の範囲であり, 各薬物の TDM を実施する上で本法は十分な定量感度が確保できていると判断できた.

Table 1-2 Recovery efficiency of drugs from serum on SPE treatment.

Medicinal drug			Recovery efficiency on SPE treatment			
No.	Name	Conc. in serum ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery rate ^{a)} (%)	RSD (%)	SPE factor f	LLOQ ^{b)} ($\mu\text{g/mL}$)
1	carbamazepine	20	96.6	3.0	1.04	0.14
3	lamotrigine	20	94.3	5.3	1.06	0.10
6	phenytoin	20	87.9	2.3	1.14	0.33
7	primidone	50	52.7	45.6	-	-
10	disopyramide	5	77.2	2.0	1.30	1.05
11	flecainide	5	92.2	3.7	1.09	0.35
12	lidocaine	10	84.9	4.0	1.18	1.13
13	mexiletine	5	87.0	5.3	1.15	0.54
14	procainamide	10	95.5	3.4	1.05	0.16
15	propafenone	5	90.8	2.5	1.10	0.88
16	quinidine	5	100.0	1.2	1.00	0.17
17	sotalol	10	110.5	1.9	0.90	0.97
20	voriconazole	5	108.5	2.6	0.92	0.66
22	mycophenolic acid	20	42.0	4.5	2.38	1.48
23	imatinib	5	87.2	2.0	1.15	0.47
24	methotrexate	50	4.8	14.1	-	-
25	pazopanib	40	95.3	5.4	1.05	1.16

a) Average value (n = 4).

b) LLOQ: Lower Limit of Quantification.

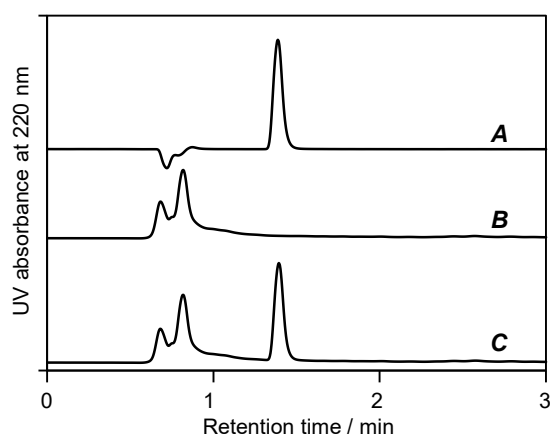


Fig. 1-2 Comparison of reversed-phase HPLC chromatograms of SPE eluate of human serums with or without added phenytoin.

A : Phenytoin (20 $\mu\text{g/mL}$) standard solution untreated with SPE. B : SPE eluate of blank (drug-free) serum. C : SPE eluate of serum with added phenytoin (20 $\mu\text{g/mL}$). Recovery rate of phenytoin on the SPE treatment : 87.9 % ; SPE factor of that: 1.1372 (see Table 2).

1.3.4 絶対検量線法による各薬物の血中濃度定量のバリデーション

本法の薬物血中濃度の定量はFig. 1-3の手順で行った. まず, 被検薬物の標準溶液についてHPLCを行い, 1点検量線を作成する(Step 1). 次に, 被検血清試料をSPE処理し, 処理液についてHPLCを行い, クロマトグラム上の薬物ピーク面積にSPEファクター(f)値を乗じて, その値(SPEでの回収誤差を補正した値)を1点検量線に当てはめて被検血清試料中の薬物濃度を決定する(Step 2).

最後に, 前項(1.3.3)およびTable 1-2でSPE回収率とファクターを算出した15品目の薬物について, 3点検量線もしくは1点検量線を用いた場合の, 有効治療濃度域内の3濃度血清試料に対する本法の定量バリデーションを行なった. Table 1-3に示したように, 3点検量線による絶対検量線法を(No. 23と25を除く)13品目に適用したところ, 真度はNo.12の1 $\mu\text{g/mL}$ 以外の項目は $\pm 15\%$ 以内を満たし, No.12の1 $\mu\text{g/mL}$ は定量下限付近であり $\pm 20\%$ 以内は満たしている. 併行精度と室内再現精度の各値は, 全て15%以内であった. また, 1点検量線による絶対検量線法を全15品目に適用したところ, いくつかの薬物(No. 10, 12, 13)の最小有効濃度の真度が3点検量線時と比べてやや低下する傾向が見られ, 統計的に有意差を認めた($p < 0.05$). しかしながら, 多くの項目では真度は $\pm 15\%$ 以内を満たしている. 一方, 併行精度と室内再現精度に関しては, 3点検量線と1点検量線で有意差を認めず, No. 17の2 $\mu\text{g/mL}$ 以外は $\pm 15\%$ 以内は満たし, No. 17の2 $\mu\text{g/mL}$ 以外も $\pm 20\%$ 以内は満たしている.

Table 1-3 Accuracy and precision of the present quantification method for fifteen different drugs.

No	Medicinal drug		Calibration with 3 different conc. levels			Calibration at only 1 conc. level		
	Name	Conc. in serum ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Accuracy (%)	Repeatability (RSD%)	Intermediate precision (RSD%)	Accuracy (%)	Repeatability (RSD%)	Intermediate precision (RSD%)
1	carbamazepine	2	99.2	1.9	6.9	98.6	6.0	4.6
		10	98.5	2.3	2.5	102.3	1.5	2.7
		20	101.5	4.0	3.0	100.0	3.0	3.0
3	lamotrigine	2	99.7	4.4	8.8	95.8	3.1	4.3
		10	102.1	4.4	3.0	97.8	3.3	2.5
		20	104.7	4.9	3.3	98.6	5.4	3.0
6	phenytoin	2	101.0	7.7	3.4	100.2	7.7	4.1
		10	102.9	5.9	2.5	102.8	5.9	1.4
		20	100.0	2.3	3.9	100.0	2.3	3.7
10	disopyramide	1	105.1	4.9	9.4	77.2	3.3	10.8
		2	105.6	2.8	12.3	78.1	4.5	6.3
		5	105.5	10.3	2.6	100.0	2.0	2.2
11	flecainide	0.5	95.3	1.6	4.9	90.2	4.4	1.4
		2	91.4	2.6	2.1	95.2	4.6	3.0
		5	100.3	3.7	2.8	104.9	0.5	2.9
12	lidocaine	1	81.1	1.9	6.3	70.2	4.3	9.9
		5	99.2	5.5	2.5	95.3	1.4	2.4
		10	103.0	4.0	2.2	100.0	4.0	1.8
13	mexiletine	0.5	100.8	7.3	9.4	84.0	8.9	7.6
		2	105.0	7.2	10.4	101.9	7.5	12.4
		5	111.9	1.4	8.3	111.6	1.4	8.9
14	procainamide	2	102.2	1.1	10.2	93.1	1.2	0.3
		5	103.0	1.3	4.8	101.1	1.4	2.3
		10	100.6	1.3	1.5	101.0	1.3	1.0
15	propafenone	0.5	99.7	8.9	6.4	100.2	3.1	2.1
		2	107.6	4.3	5.7	94.0	1.1	6.6
		5	108.2	3.3	5.2	100.0	2.5	5.3
16	quinidine	1	102.1	2.5	5.6	89.8	3.0	2.8
		2	93.6	0.7	3.0	88.8	0.7	2.5
		5	102.8	1.8	1.4	103.1	1.85	1.5
17	sotalol	2	104.3	3.9	11.1	106.9	2.4	15.8
		5	104.8	0.9	8.5	99.7	2.3	9.5
		10	100.3	3.4	4.8	95.9	2.5	4.6
20	voriconazole	1	111.3	1.6	4.1	91.9	1.7	2.2
		2	101.0	1.8	3.1	90.0	1.1	1.4
		5	100.2	2.6	0.7	95.2	2.1	1.6
22	mycophenolic acid	1	106.2	2.5	8.5	119.1	5.2	0.3
		5	110.2	3.3	1.5	105.8	4.5	3.1
		20	99.7	4.5	2.1	97.9	8.2	2.2
23	imatinib	1	-	-	-	92.7	6.9	11.1
		2	-	-	-	97.2	1.6	11.8
		5	-	-	-	104.9	2.0	6.7
25	pazopanib	5	-	-	-	96.0	4.1	6.0
		20	-	-	-	100.9	4.3	5.4
		40	-	-	-	104.9	1.8	9.4

Accuracy (%) was calculated from the data of quadruplicate samples ($n = 4$) at a given concentration of each drug; Repeatability (RSD%) was also from quadruplicate samples ($n = 4$); Intermediate precision (RSD%) was calculated over a series of three analyses on different days (3 days).

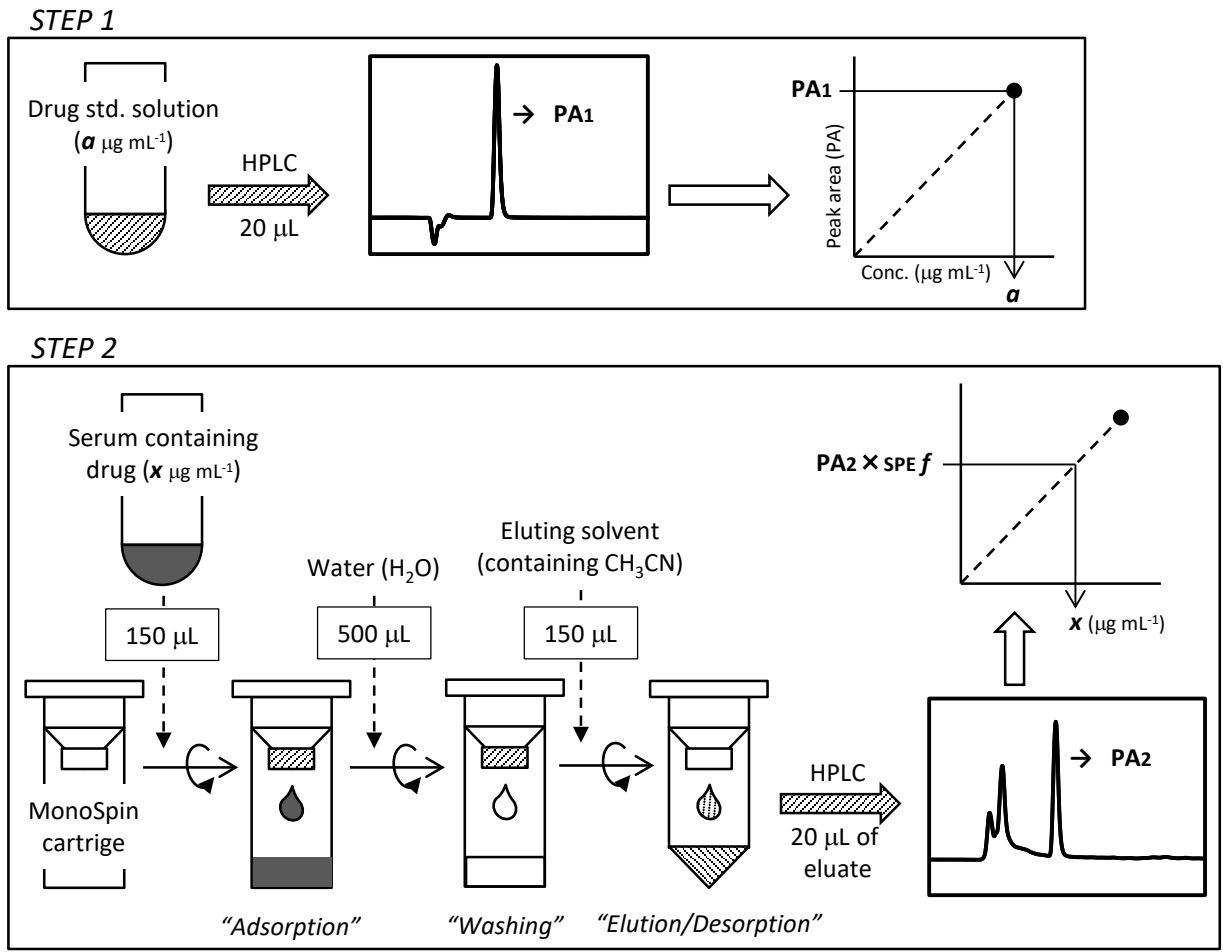


Fig. 1-3 Schematic procedure of the present method for in-hospital quantitation of a blood level of a medicinal drug.

1.4 考察

本研究の HPLC システムは、院内測定用としての実用性と経済性を重視し、かつオペレーターが分析に不慣れな医療関係者であることも考慮した上で、構築した。HPLC 装置本体は、最も一般的で扱いやすく安定性に優れる UV 検出器を備えたコンベンショナルな分析システムとして構成した。UV 検出波長は薬物ごとに最適化した。分離モードは、薬物の適用範囲が最も広く高理論段が期待できる「ODS シリカ固定相を用いる逆相分配モード」を選択した。分離カラムは、一般的な微粒子充填カラムよりも低背圧で、気泡や汚れ詰まりが抜けやすく、ガードカラムの交換が容易な一体成型の ODS シリカモノリスカラムを採用した。移動相溶媒は、CH₃CN (A 液) と 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5, B 液) の二種類のみとし、両溶液を送液ポンプ内で任意の割合で混合し、2.0 mL/min の流速でイソクラティック送液した。A 液と B 液の混合比率は、溶質の被検薬物が分離カラムを素通りせずかつ 3 分以内に溶出するように、薬物毎に最適化した。

今回、1.2.1 項記載の基準に基づいて選択した特定薬剤治療管理料の対象薬 (24 品目) に経口分子標的抗がん剤 pazopanib を加えた計 25 品目について、どの薬剤も本 HPLC システムによる基本的な分析条件を構築することができた。Fig. 1-1 においては各薬物の代謝物の分離を考慮していないが、今回の定量は各薬物の未変化体の濃度定量に限定して HPLC 条件を最適化している。この分離条件下では、薬物の未変化体と官能基変化を伴う代謝物は、共存したとしても十分に分離する性能を有していると考えている。しかしながら、臨床現場では多剤併用する患者が多くいるため、各分析法に関する選択性の検討は引き続き実施していく必要がある。

一方で、25 品目の薬物について、HPLC 分析に先立つ固相抽出 (SPE) 前処理条件を検討した。SPE 用の使い捨て固相カートリッジとしては、遠心用スピナーカートリッジである MonoSpin を選択した。このカートリッジの特徴は、1) 固相媒体がロット差の小さなシリカモノリスディスク、2) 微量の試料 (血清 150 μ L) 処理に最適のサイズ、3) 吸着・洗浄・溶出などの通液操作を全て遠心分離で行うため、一定条件下での多検体処理ができる、等であり、本研究の用途に最適であった。

しかし、いくつかの薬物では回収不良の事例も見られた。例えば、methotrexate (No.24) の回収率は 4.8% であった。また、primidone (No.7) は回収率が低い (52.7%) だけでなく、RSD% が不良 (45.6%) であった。その理由の一つとしては、これらの薬物と血清タンパク質との結合が強い可能性が考えられる。この点に関して事前の予試験において、imatinib (No.23) と pazopanib (No.25) にも類似の挙動が認められたため、両薬物については SPE 処理手順の若干の改善を試みた。具体的には、まず、薬物添加血清 150 μ L に同量の 30% CH₃CN 水溶液を加えてあらかじめ希釈 (薬物のタンパク結合を緩める) してから、全量 300 μ L を SPE カラムへ通液し、所定の処理を行った。Pazopanib の事例では、この希釈操作により SPE 回収率が劇的に改善した (希釈なし : 30% \rightarrow 希釈あり : 95%)。Imatinib では希釈ありの場合で回収率の再現性 (RSD%) が向上した。なお、今のところこの改良手順は両薬物のみでしか検討していないが、回収率が悪かった No.7, 22, 24 等の薬物においても同様の効果が得られる可能性があると考えている。

本章で構築した院内測定を前提とする実用的な薬物定量法の手順を Fig. 1-3 に示したが、この定量法の特徴は以下の通りである。

- 1) 内標準法ではなく、絶対検量線法であること。
- 2) 検量線用の標準液として、被検薬物の標準溶液を SPE 処理を行わずに HPLC に注入すること。
- 3) 検量線は、各薬物の有効治療域内の最大濃度の 1 点検量線とすること。

通常、HPLC 定量において測定精度を重視する場合は「多点検量線による内標準法」が用いられるが、本法のように前処理で SPE を行う場合、適切な内標準物質 (IS) の選定は難しく、全ての被検薬物の安定同位体標識体を IS として用意するのは現実的ではない。また、検量線用の標準液は管理が容易で扱いやすいことが重要であり、実用性の観点からその点数は少ないほど望ましい。

なお、この方法では、被検薬物の SPE 回収率をほぼ 100%にできれば、SPE ファクター (f) 値で補正する必要がなくなり、定量がより簡略化する。従って、pazopanib (No.25) の事例のように、各薬物の SPE 処理条件は詳細に検討・最適化しておくことが肝要である。

本研究ではヒト標準血清を用いたが、患者血清は用いておらず、実臨床においても応用が可能かどうかは検討できていない。さらに、3 点検量線と 1 点検量線で真度に違いがあった点には注意し、1 点検量線を用いた絶対検量線法が実臨床検体で十分に実用性があるかどうかも検討する必要がある。しかしながら、本法は定量値の真度や繰り返し精度の両面で、院内 TDM 実施のための実用的な測定法として十分な性能を有していると判断することができ、臨床検体による検討を行う価値があると考えられる。

1.5 小括

医療機関における血中薬物濃度定量に基づく治療薬物モニタリング (TDM) の実施は、投与された薬物の治療効果や副作用を見極めるうえで重要であるが、その定量分析法は薬物ごとに異なり、複雑な前処理や特殊な試薬・機器類が必要な手法も多いため、医療機関内での TDM 業務は決して容易ではない。

今回、多品目の薬物に対して、ほぼ同一手順の前処理操作と単一装置での HPLC 分析を行う、迅速で実用的な血中濃度定量法を考案した。具体的には、まず薬物ごとに、遠心用スピんカートリッジを用いる前処理 (固相抽出) 条件と、逆相 HPLC-UV 検出条件を最適化した。

さらに、各薬物添加血清を用いて上述の前処理と HPLC を行い、血清からの薬物回収率を補正したうえで、薬物標準液を用いる絶対検量線法に基づく定量法として最適化した。

本法は 15 品目の薬物の血中濃度定量に適用でき、各薬物の定量下限値は 0.1~1.5 $\mu\text{g/mL}$ の範囲であった。各薬物の治療有効濃度領域内での定量バリデーションも良好であり、本法は、病院の常勤スタッフ (臨床検査技師や薬剤師) が日常的に実施する院内測定法として有用と考えられる。

この結果を踏まえて、第 2 章では、当院倫理委員会の承認を経て、上記薬物血中濃度測定法を用いて院内での実証研究を行った。

第 2 章 HPLC-UV プラットフォームによる TDM 対象薬の院内定量の実施および定量性能評価

2.1 緒言

臨床現場の TDM 業務における薬物血中濃度測定法は、精度や迅速性、検査コストなどの観点から考慮される。多品目の薬物血中濃度の定量分析法は、LBA 法と LC 法に大別される^{40, 41)}。LBA 法（特にイムノアッセイ）は、薬物血中濃度測定だけでなく、他の生化学検査等も測定できる自動分析装置として普及し、本邦でも多くの病院が導入している。しかし LBA 法は、標的薬物（リガンド）に特異的に結合する抗体等を利用して間接的に血中濃度を定量するため、抗体の交差反応によって LC 法よりも真度や精度が劣る点が問題となる⁴⁰⁾。また、当然ながら対応する抗体を持たない薬物の定量分析には適用できない。一方の LC 法は、クロマトグラフィー分離後にオンライン検出器を用いて対象薬物の血中濃度を直接定量する方法なので、LBA 法よりも定量値の真度と精度が高いという利点がある⁴¹⁾。

TDM を実施するための HPLC プラットフォームの中で、タンデム質量分析計を備えた HPLC-MS/MS は、感度や選択性、汎用性の面で優れた性能を有している⁴⁰⁾。さらに、最近では臨床検査室での HPLC-MS/MS の応用の報告も増えている⁴²⁻⁴⁵⁾。しかし、HPLC-MS/MS 装置の導入と維持管理に高いコストがかかるため、本邦においては HPLC-MS/MS 法はあまり使用されていない²⁹⁾。したがって、LBA 法の装置や HPLC-MS/MS 装置も持たない病院では、分析結果を得るまでに時間のかかる外注に頼らざるを得ない^{4, 28)}。

このような HPLC-MS/MS の限界に直面すると、UV 検出器を備えた HPLC-UV の実用的価値が再認識され、臨床現場での TDM における利用が再注目される。例えば土下らは、抗不整脈薬の TDM に際して HPLC-UV を用いた病院内での定量分析業務を実施し、臨床的にも経済的にも有用であることを報告している³⁷⁾。また、数種類の抗菌薬の TDM をターゲットとしたシンプルで経済的な HPLC-UV 法の有用性も報告されている⁴⁶⁻⁴⁷⁾。しかしながら、これら報告の HPLC 条件（前抽出手順、分離カラム、移動相溶媒の流速や組成、検出 UV 波長など）は薬剤毎に異なっており、複数の薬剤を分析するための一つの HPLC プラットフォームとしては確立できていない。そのため、対象薬剤毎にその都度 HPLC 条件を再設定することが分析担当者の負担となり、HPLC による分析自体を断念してしまう。

このような現状を踏まえ、著者らは、第 1 章において、多品目の薬物の血中濃度を院内で迅速に測定するための実用的な HPLC プラットフォームを開発した。このプラットフォームは、使い捨ての遠心分離カートリッジを使用して血清中の薬物を容易に固相抽出し、その後、逆相（RP）HPLC-UV 装置を使用して迅速に定量するものである。このプラットフォームは、ほぼ同じ手順で、分析カラムや移動相の変更のない同じ HPLC-UV 装置を用いて、15 種類の薬物（カルバマゼピン [CBZ]、フェニトイン

[PHT], ラモトリギン [LTG], ジソピラミド, フレカイニド, メキシレチン, リドカイン, メキシレチン, プロカインアミド, プロパフェノン, キニジン, ソタロール, ボリコナゾール [VRCZ], ミコフェノール酸, イマチニブ, パゾパニブ) の血中濃度定量に適用できることを実証した. しかしながら, これらは実臨床検体を用いた検討ではなく, 前処理条件や HPLC 条件に修正が必要かもしれない.

本章では, この実用的な HPLC-UV プラットフォームを用いて, 当院における 5 種類の薬剤 (CBZ, PHT, LTG, VRCZ およびバンコマイシン [VCM]) について, 臨床検査技師および薬剤師が日常業務と並行して使用し, 実臨床検体を用いてプラットフォームの改良を行った. VCM は第 1 章で検討した以外の薬剤ではあるが, 臨床現場の TDM で数多く使用される薬物の一つであり, 追加検討する価値があると考えた. さらに, 本法以外の血中濃度定量法として, 通常業務として院内の自動分析装置 (cobas®) による測定と外注 (HPLC-MS/MS) による測定も行い, 本法で得た薬物定量値と cobas および HPLC-MS/MS での検査結果を比較評価した.

2.2 方法

2.2.1 試薬・医薬品

PHT, LTG, VCM および酢酸アンモニウム三水和物は, 富士フイルム和光純薬から購入した. CBZ と VRCZ は東京化成工業から購入した. アセトニトリル (CH_3CN ; HPLC 用) は, 関東化学株式会社から購入した. 滅菌精製水は, 光製薬から購入した. 本定量法のバリデーションには, 富士フイルム和光純薬のヒト標準血清 (Normal human serum; NHS) を使用した.

2.2.2 患者血清

本研究では, 医師が通常診療でオーダーした一般生化学検査後に回収された患者の残余血清を使用した. 血清は, 北信総合病院で CBZ, PHT, LTG, VCM, VRCZ の治療を受けた患者から得たものである. 本研究は, 同院の倫理委員会の承認を得て実施した (受付番号: 2016004). 本研究は, 残余血清を用いた研究であり, 2016 年当時の本邦の倫理指針に基づき, 対象となる患者から直接同意を受けずに実施したが, あらかじめ研究内容に関して文書で院内に公開し, 患者自身が拒否できる機会を設けた (オプトアウト).

2.2.3 SPE カートリッジと SPE プロトコルの最適化

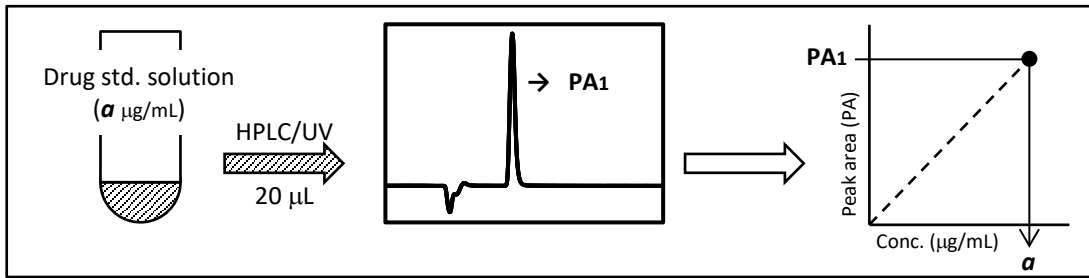
患者血清中の各薬物濃度の HPLC 分析前の SPE 処理には, モノリス型 C18-シリカディスク内蔵遠心式スピナーカートリッジ MonoSpin C18 (ジーエルサイエンス製) を使用した. MonoSpin カートリッジは, 使用前に CH_3CN と水をそれぞれ 500 μL ずつ順次通過させて前処理を行った. 遠心分離機 (Himac CT15E; 工機ホールディングス) を用いて 5,000 rpm ($2,400\times g$) 1 min で遠心分離し, 各溶液をカートリッジに通液した. 前処理したカートリッジを用いた SPE 操作の詳細は以下の通りである.

- 1) 患者血清を DISMIC 13HP シリンジフィルター (0.45 μm ; ADVANTEC 製) でろ過し, ろ過した血清 (150 μL) を MonoSpin C18 カートリッジにロードし, 3 分間遠心分離を行った.
- 2) 水 (500 μL ; 洗浄液) を 2 分間遠心分離してカートリッジに通した.
- 3) CH_3CN を含む水溶液 (150 μL ; 溶出液) を 1 分間遠心分離してカートリッジに通し, 薬物を含む最終溶出液を試験管に採取して, その後の HPLC 分析に使用した.

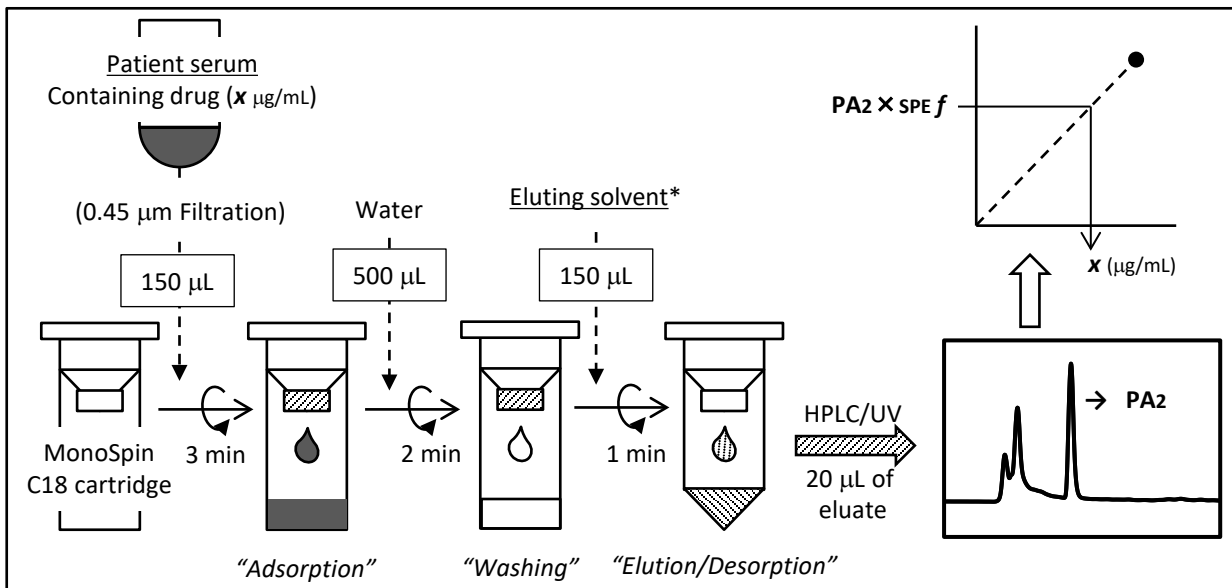
事前検討において, 第 1 章のプロトコルのまま患者血清をカートリッジに通液すると目視上明らかに通液が不十分で, 測定結果のばらつきも認めためメンブランフィルターを用いた点を付記する.

各薬剤 (CBZ, PHT, VCM, LTG, VRCZ) の血中濃度を定量するための最適化した SPE 法プロトコルを Fig. 2-1 に模式的に示す.

STEP 1: Preparation of one-point calibration plot for quantitation of a target drug



STEP 2: SPE treatment and subsequent HPLC analysis of drug levels in patient sera



* Eluting solvent for CBT, PHT, LTG, and VRCZ: aq.50% CH_3CN
 Eluting solvent for VCM: aq.30% CH_3CN

Fig. 2-1 Schematic of the present quantification method of drug levels in patient sera.

2.2.4 HPLC 装置と HPLC 条件の最適化

HPLC 分析は Chromaster システム (日立ハイテクサイエンス製) を用いて実施した。本システムは、5310 カラムオープン、5210 オートサンプラー、5110 ポンプ、5430 ダイオードアレイ検出器から構成されている。各薬物 (PHT, LTG, VCM, CBZ, VRCZ) の RP-HPLC 分離は、ガードカラム (内径 5 mm×4.6 mm) を備えた Chromolith HighResolution RP-18 カラム (100 mm×4.6 mm i.d.; メルク製) を用いて 30°C で実施した。HPLC 分析の移動相溶媒は、A 液 (CH_3CN) と B 液 (10 mM 酢酸緩衝液, pH 5.0) の 2 種類の溶液を送液ポンプ内で任意の割合に混合し、イソクラティック溶出またはグラジエント溶出を行った。例えば、CBZ を含む血清 (注入量: 20 μL) を分析する際は、混合溶媒 (A : B = 40 : 60, v/v) により 2.0 mL/min の流速で 3 分かけてイソクラティック送液し、溶出液中の CBZ を 280 nm の紫外線吸収により検出した。5 種

類の薬物の最適化された HPLC 条件の詳細は、Table 2-1 に示し、VCM はグラジエント溶出を行いその詳細を Table 2-2 に示す。

Table 2-1 Optimized RP-HPLC conditions for drug quantification.

Drug ^{a)}	Mobile phase condition		UV Detection
	Elution program & solvent composition ^{b)}	Flow rate (mL/min)	wavelength (nm)
CBZ	Isocratic elution of 40% A, for 3 min	2.0	280
PHT	Isocratic elution of 40% A, for 3 min	2.0	220
VCM	Linear gradient elution (See Table 2-2)	2.0	235
LTG	Isocratic elution of 25% A, for 3 min	2.0	210
VRCZ	Isocratic elution of 40% A, for 3 min	2.0	254

^{a)} CBZ: carbamazepine, PHT: phenytoin, VCM: vancomycin, LTG: lamotrigine, VRCZ: voriconazole.

^{b)} Each mobile-phase solvent is a mixture of solvent A (CH₃CN) and solvent B (10 mM acetate buffer, pH 5).

Table 2-2 HPLC conditions for VCM.

The mobile phase, consisting of solvent A (CH₃CN) and solvent B (10 mM acetate buffer, pH 5), was delivered at 2.0 mL/min in gradient mode.

Time (min)	%A	%B
0	5	95
3.0	30	70
3.1	60	40
4.5	60	40
4.6	5	95
7.0	5	95

2.2.5 分析法バリデーション

各薬剤の添加血清（CBZ, PHT, LTG は 20 µg/mL, VCM は 50 µg/mL, VRCZ は 5 µg/mL）の SPE 溶出液の HPLC データから、HPLC 定量用に 1 点検量線を作成した。各薬剤の添加血清（CBZ, PHT, LTG は 2 µg/mL, VCM は 3 µg/mL, VRCZ は 1 µg/mL）の SPE 溶出液のクロマトグラムから検出限界（LOD）、定量限界（LOQ）および定量下限（LLOQ）をそれぞれ 3 : 1, 10 : 1 および 5 : 1 の S/N 比で算出した。

併行精度（repeatability）は QC 試料（例えば、PHT は、2, 10, 20 µg/mL で調整した血清）を同日に 4 回分析し、室内再現精度（intermediate precision）は QC 試料を 3 日に分けて 1 回分析することにより実施した。真度（accuracy; %）は、測定値/理論値 × 100 で算出した。併行精度（repeatability; RSD%）は、相対変動係数（CV）として、

標準偏差/測定濃度の平均値×100 で算出した。

さらに、同じ臨床検査技師によって、同一の患者血清を用いて3回繰り返し測定して精度を評価した。この評価ではCBZ服用患者13検体、PHT服用患者4検体、LTG服用患者2検体、VRCZ服用患者2検体を用いた。

2.2.6 LBA法 (cobas) を用いた患者血清中の薬物濃度の定量

CBZ, PHT, VCMの患者血清濃度は、日常の臨床検査業務で使用しているLBA法の全自動分析装置cobas® 6000<501> (ロシュ・ダイアグノスティックス製) による測定も行った。この測定に使用した患者血清の数は、CBZが23, PHTが20, VCMが20であった。当院では7種類の薬剤 (CBZ, PHT, VCM, フェノバルビタール, バルプロ酸ナトリウム, ジゴキシン, テオフィリン) の血中濃度測定にcobasがルーチンで使用されている。本研究では、cobasを用いた定量測定はすべて臨床検査技師の日常業務で実施した。

2.2.7 HPLC-MS/MS を用いた患者血清中の薬物濃度の定量

LTGとVRCZの患者血清濃度は、臨床検査会社のエスアールエルに依頼し、HPLC-MS/MSによる測定も日常診療通りに行った。この測定に使用した患者血清の数は、LTGとVRCZで各9本であった。今回のHPLC-MS/MSの測定条件の詳細については、SRLから開示されていない。患者の血清をSRLに送付してから、定量結果のフィードバックがあるまでに、薬剤によっては1週間ほどかかることがある。

2.2.8 血清中薬物濃度の2種類の定量法間の一致度を分析する際に用いたデータプロット法

HPLC-UVとcobas, またはHPLC-UVとHPLC-MS/MSの2種類の方法で別々に定量した患者血清中の薬物濃度の一致性について、Passing-Bablok回帰分析とBland-Altman分析を実施した。HPLC-UVと別の方法 (cobasまたはHPLC-MS/MS) で定量した合計75件のデータについて、Bland-Altmanプロット⁴⁸⁾を作成し、2つの測定法の差の平均と誤差の許容範囲 (limits of agreement ; LOA) を示した。2つの測定方法の差が誤差範囲内 (LOA) であれば、2つの測定方法は同等である (一致性がある) と解釈することができる。LOAは、「差の平均値±1.96×差の標準偏差 (SD)」で算出した。

2.3 結果

2.3.1 前処理および HPLC 条件最適化後の HPLC-UV プラットフォーム

臨床検体を用いた検討の前に、4 種類の薬剤 (CBZ, PHT, LTG, VRCZ) の血清中濃度を定量するための第 1 章の方法を、患者血清に合わせて若干修正し、最適化した。具体的には、すべての患者血清を SPE 処理前にメンブレンフィルター (0.45 μm) に通液し、SPE カートリッジの遠心分離時間を各ステップごとに再調整した。本法による患者血清中の薬物濃度を定量する概略手順を Fig.1 に示す。各薬剤の SPE 処理シリーズの作業時間は 10 分以内であり、当院では臨床検査技師や薬剤師が日常業務の合間に患者血清の SPE 処理を行うことが可能であった。

さらに、本法による VCM の血中濃度測定も新しく検討し、分析条件を構築した。VCM に対して最適化された SPE 処理条件の詳細を Fig. 2-1 に、HPLC-UV 操作の詳細を Table 2-1 および Table 2-2 に示す。

上記の分析条件の最適化後、CBZ, PHT, VCM, LTG, VRCZ の各最適化メソッドをそれぞれ適用して、患者の血清中の各薬物濃度を定量した。Fig. 2-2 に本 HPLC-UV 法を用いて、5 種類の薬物をそれぞれ服用している患者の血清から検出されたクロマトグラムを示す。いずれのクロマトグラムもピーク形状はシャープであり、極端なテーリングやリーディング、ショルダーピーク、ピーク割れ等の異常は見られず、3 分以内に速やかに分離検出できた。

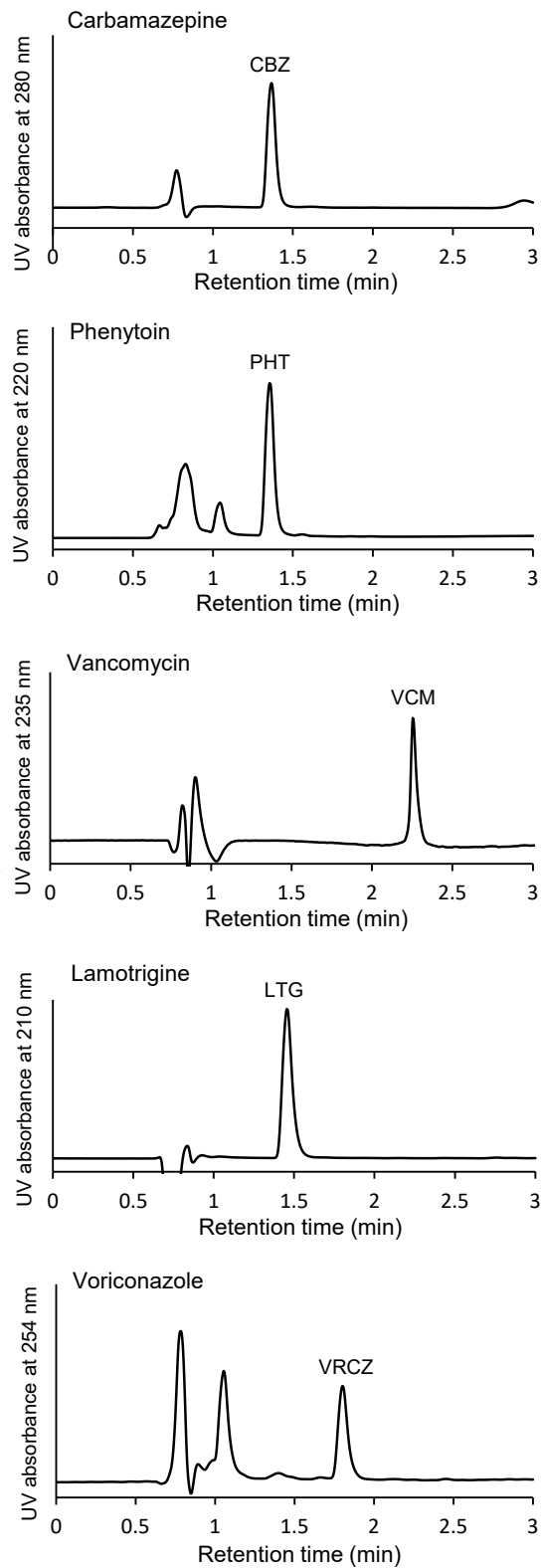


Fig. 2-2 HPLC-UV chromatograms of carbamazepine (CBZ), phenytoin (PHT), vancomycin (VCM), lamotrigine (LTG) and voriconazole (VRCZ) detected from patient sera by the present quantification method.

2.3.2 HPLC-UV プラットフォームを用いた本定量法のバリデーション

本 HPLC-UV プラットフォームを用いた 5 種類の薬物に対する本定量法の性能について、各薬物を添加した血清を用いたバリデーションを行い、その結果を Table 2-3, 2-4, 2-5 に示した。Table 2-3 に各薬剤の回収効率（回収率と SPE factor）および限界値（LOD, LOQ, LLOQ）を示した。回収率は 87.9%（PHT）～108.5%（VRCZ）と適切であり、LLOQ はすべて 1 $\mu\text{g/mL}$ 以下だった。Table 2-4 は、本定量法の各薬剤に対する精度および真度のデータを示している。真度（Accuracy）は 91.3%（VCM 50 $\mu\text{g/mL}$ ）から 108.3%（CBZ 2 $\mu\text{g/mL}$ ）の間で適切な値を示した。また、繰返し精度（Repeatability）および中間精度（Intermediate precision）については、VCM 1 $\mu\text{g/mL}$ を除き（それぞれ 10.6% および 18.6%）、いずれも 10% 以下と良好な値を示した。

一方、同一検体における血清薬物濃度の再現性（3 回）について、同一分析者（臨床検査技師）により検討した結果を Table 2-5 に示す。対象血清は、CBZ 13 本、PHT 4 本、LTG 2 本、VRCZ 2 本（計 21 本）であった。各測定値の相対標準偏差（RSD）値は 1.13% から 16.67% であり、本法の再現性は信頼できることが確認された。

Table 2-3 Recovery efficiency and limit values of the five drugs in the present quantification method using our HPLC-UV platform.

Drug		Recovery efficiency		Limit values		
Name ^{a)}	Conc. in serum ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery rate ^{b)} (%)	SPE factor f	LOD ^{c)} ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ^{d)} ($\mu\text{g/mL}$)	LLOQ ^{e)} ($\mu\text{g/mL}$)
CBZ	2			0.084	0.279	0.140
	20	96.6	1.04			
PHT	2			0.198	0.660	0.330
	20	87.9	1.14			
VCM	3			0.061	0.205	0.102
	20	85.2	1.17			
LTG	2			0.059	0.196	0.098
	20	94.3	1.06			
VRCZ	1			0.393	1.312	0.656
	5	108.5	0.92			

^{a)} CBZ: carbamazepine, PHT: phenytoin, VCM: vancomycin, LTG: lamotrigine, VRCZ: voriconazole.

^{b)} Average value (n=4). ^{c)} LOD: the limit of detection. ^{d)} LOQ: the limit of quantitation. ^{e)} LLOQ: the lower limit of quantitation.

Table 2-4 Accuracy and precision data of five drugs in the present quantification method using our HPLC-UV platform.

Analyte ^{a)}	Conc. in serum ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy ^{b)} (%)	Repeatability ^{c)} (CV%)	Intermediate precision ^{d)} (CV%)
CBZ	2	98.6	6.0	4.5
	10	102.3	1.5	2.7
	20	100.0	3.0	3.0
PHT	2	100.2	7.7	4.1
	10	102.8	5.9	1.4
	20	100.0	2.3	3.7
VCM	1	105.7	10.6	18.6
	10	91.5	8.2	9.2
	50	91.3	5.1	8.7
LTG	2	95.8	3.1	4.3
	10	102.1	3.3	2.5
	20	104.7	5.4	3.0
VRCZ	1	91.9	1.7	2.2
	2	90.0	1.1	1.4
	5	95.2	2.1	1.6

^{a)} CBZ: carbamazepine, PHT: phenytoin, VCM: vancomycin, LTG: lamotrigine, VRCZ: voriconazole.

^{b)} The accuracy (%) was calculated from the data of five samples (n=5) at a given concentration of each drug.

^{c)} The repeatability (CV%) was calculated from quadruplicate samples (n=4).

^{d)} The intermediate precision (CV%) was calculated over a series of three analyses on different days (3 days).

Table 2-5. Accuracy of the HPLC-UV platform in repeated drug measurements of patient sera.

No.	drugs	AVR (n=3)	SD (n=3)	RSD %
1	carbamazepine	5.94	0.2	3.37
2	carbamazepine	7.05	0.85	12.11
3	carbamazepine	8.01	0.1	1.19
4	carbamazepine	4.87	0.12	2.38
5	carbamazepine	7.23	0.08	1.13
6	carbamazepine	9.22	0.08	0.86
7	carbamazepine	9.15	0.22	2.42
8	carbamazepine	8.46	0.17	2.01
9	carbamazepine	7.57	0.41	5.39
10	carbamazepine	6.93	0.09	1.3
11	carbamazepine	6.59	0.21	3.21
12	carbamazepine	7.28	0.15	2.02
13	carbamazepine	7.48	0.15	2.06
14	phenytoin	13.72	0.28	2.05
15	phenytoin	6.43	0.17	2.61
16	phenytoin	9.98	0.14	1.42
17	phenytoin	11.93	1.46	12.22
18	lamotrigine	0.7	0.07	10.48
19	lamotrigine	5.78	0.96	16.67
20	voriconazole	0.61	0.01	1.13
21	voriconazole	4.07	0.34	8.27

2.3.3 HPLC-UV と cobas および HPLC-UV と HPLC-MS/MS の相関性の評価

Fig. 2-3 は、本 HPLC-UV プラットフォームと cobas (LBA 分析装置) で別々に定量した血清薬物濃度 (CBZ, PHT, VCM) の Passing-Bablok 回帰分析および Bland-Altman 分析の結果である。Passing-Bablok 回帰プロットは、A1, B1, C1 に示すように、CBZ の回帰係数は 1.1812 (n=23, 決定係数 $[R^2] = 0.9768$), PHT の回帰係数は 1.1414 (n=14, $R^2=0.9655$), VCM の回帰係数は 0.9978 (n=20, $R^2=0.9600$) であった。CBZ および PHT の cobas による値は、HPLC-UV 法による値と比較して、 $-1 \sim -2 \mu\text{g/mL}$ の差を認めた。さらに、A2, B2, C2 に示した Bland-Altman プロットのうち、B2 の PHT で平均差が最も大きかった ($-2.1 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$)。Bland-Altman プロットでは、95%LOA は、CBZ ; $-2.31 \sim -0.53 \mu\text{g/mL}$ (A2), PHT ; $-4.91 \sim 0.73 \mu\text{g/mL}$ (B2), VCM ; $-3.44 \sim 2.14 \mu\text{g/mL}$ (C2) であった。以上から、HPLC-UV 法と cobas による定量値の相関性は良好であるが、CBZ と PHT に関しては本 HPLC-UV 法による値の方が cobas による値より高いことが分かった。

さらに、Fig.2-4 は、本 HPLC-UV プラットフォームと外注の HPLC-MS/MS 分析で別々に定量した血清薬物濃度 (LTG と VRCZ) の Passing-Bablok 回帰分析および Bland-Altman 分析結果である。Passing-Bablok 回帰プロットは、D1 および E1 に示すように、LTG の回帰係数は 0.9876 (n=9, $R^2=0.9380$), VRCZ の回帰係数は 0.9499 (n=9, $R^2=0.9421$) であった。さらに、D2 および E2 に示した Bland-Altman プロットのうち、95%LOA は、

LTG ; $-1.63 \sim -0.55 \mu\text{g/mL}$ (D2) および VRCZ ; $-0.86 \sim 0.83 \mu\text{g/mL}$ (E2) であった。
 以上から、HPLC-UV 法と HPLC-MS/MS 法の定量値の相関性は良好で、臨床で評価する上で注意するような差は見られなかった。

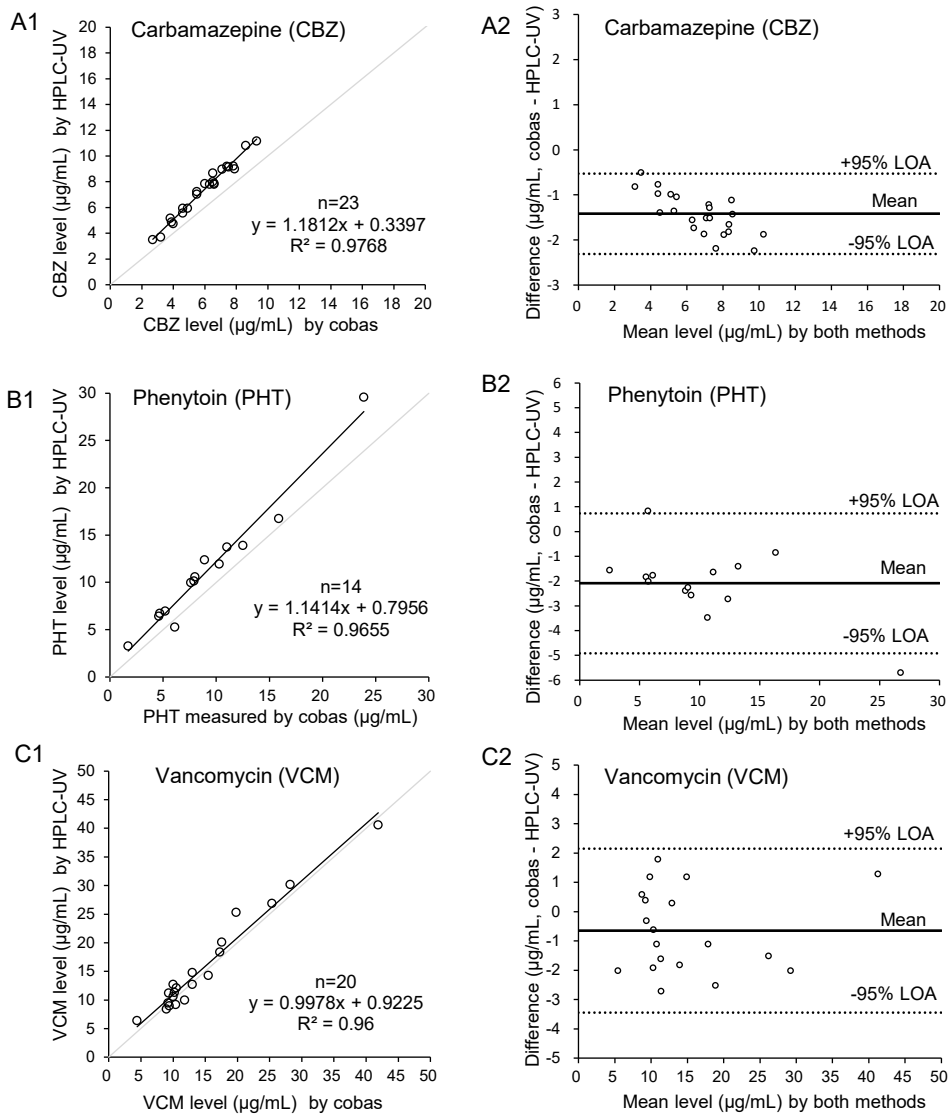


Fig. 2-3 Comparison of Passing-Bablok regression analysis (A1, B1, C1) and Bland-Altman analysis (A2, B2, C2) results of serum levels of the three drugs (CBZ, PHT, VCM), which were separately quantified by the present HPLC-UV platform and by the cobas® analyzer. Both quantifications were performed in our hospital.

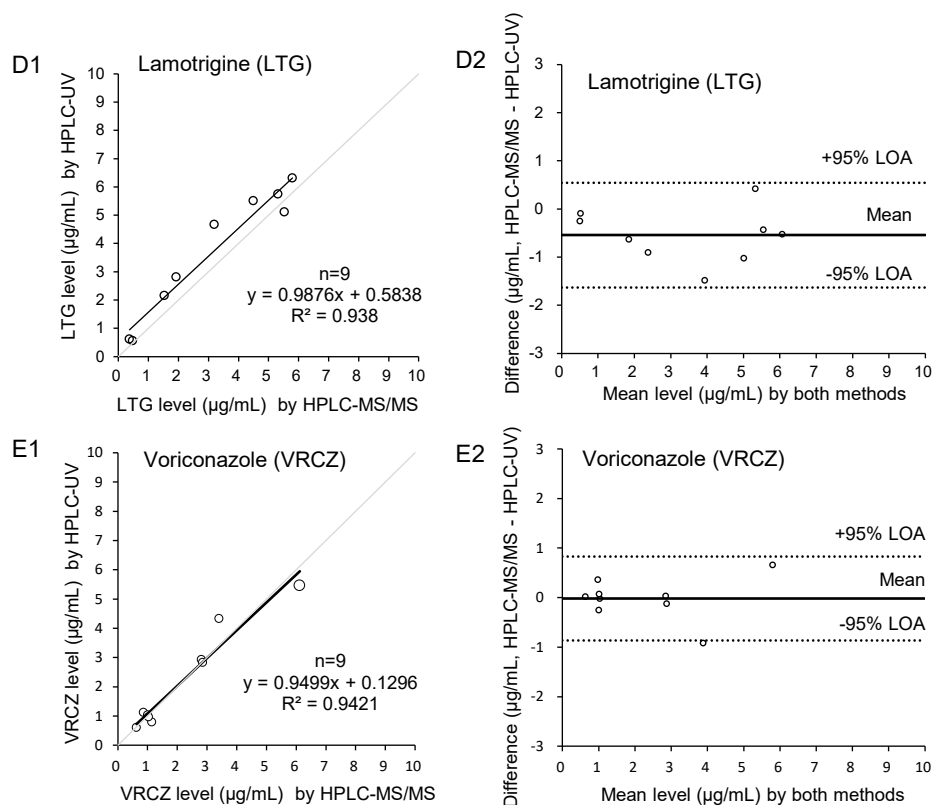


Fig. 2-4. Comparison of Passing–Bablok regression analysis (D1, E1) and Bland–Altman analysis (D2, E2) results of the serum levels of two drugs (LTG, VRCZ), which were separately quantified by the present HPLC-UV platform and by a HPLC-MS/MS system. Quantification by HPLC-UV was performed in our hospital, while that by HPLC-MS/MS was conducted by the outsourced provider (SRL, Inc.).

2.4 考察

本 HPLC-UV プラットフォームは、多くの病院で使用できるように、実用性と経済性を重視して構築した。また、操作者は HPLC 分析に不慣れなスタッフであっても測定できるように検討した。今回測定を行った臨床検査技師は HPLC 分析には不慣れであったが、同一患者血清試料における薬物定量再現性の結果から信頼性と再現性が高く (Table 2-5)、本プラットフォームの手順 (Fig. 2-1) が実用的であることが示唆された。さらに、本 HPLC-UV プラットフォームの定量バリデーション結果は適切であり (Table 2-3, 2-4)、日々の TDM 業務に十分対応できる性能を有している。一方、HPLC-UV 法の定量値は他法と良好な相関を示したが (Table 2-3, 2-4)、CBZ と PHT に関しては本法による値の方が cobas による値より高かった (Fig. 2-3)。これは、HPLC 法は対象薬物の血中濃度を直接定量する方法だが、LBA 法は間接法であることがこの定量値の違いになったと推察する⁴¹⁾。本 HPLC-UV プラットフォームによる CBZ と PHT の真度はほぼ 100%のため (Table 2-4)、cobas を用いた結果がやや低めになる点は TDM を行う際に注意が必要である。また、VRCZ に関して、本プラットフォームと LC-MS/MS による 95%LOA が約±1 µg/mL であり (Fig. 2-4)、VRCZ の安全域と治療域は比較的狭いため、TDM において重要な違いである可能性がある。本研究ではサンプル数が少ないため、この影響については追加検討する価値がある。

本 HPLC-UV プラットフォームでは、1) 前処理条件、2) HPLC/UV 条件、3) 絶対検量線法の最適化を行い、臨床応用の可能性を確認した。

まず、前処理条件については、SPE 法として使い捨ての遠心式スピナーカートリッジである MonoSpin を選択した。このカートリッジの特徴は、1) 固相媒体が小型のシリカモノリスディスク、2) 少量のサンプル (血清 150 µL) に対応可能なサイズ、3) すべての通液操作 (吸着、洗浄、溶出など) を遠心分離で行うため、多検体処理に適していること、などが挙げられる。SPE 法と質量分析計や UV 検出器を用いた HPLC を組み合わせた血中薬物濃度分析法は数多く報告されている⁴⁹⁻⁶¹⁾。本法も SPE 法と HPLC/UV を組み合わせたものであり、SPE 法による前処理は、各薬物に対してほぼ同じ手順で行い (Fig. 2-1)、HPLC-UV で使用する 2 種類の移動相は、測定する薬物ごとに変更する必要はないように固定設定した。そのため、本 HPLC-UV プラットフォームでは、様々な薬物の血中濃度を簡便に分析することができる。

第二に、安定な UV 検出器と ODS シリカモノリスカラムを使用したことが、本プラットフォーム構築の成功に寄与した。ガードカラム (約 3 ヶ月毎) とモノリスカラム (6 ヶ月毎) の定期的な交換により、カラムに起因するトラブルの可能性を極めて低くすることができた。実際、本研究ではカラムトラブルを認めなかった。これまでも TDM のためにモノリスカラムを用いた報告はあるが⁶²⁻⁶⁵⁾、その多くは単剤または同効薬群に対して使用されている。本 HPLC-UV プラットフォームでは、5 種類の薬剤 (CBZ, PHT, LTG, VCM, VRCZ) の患者血清中濃度を定量することができたが、第 1 章で示した 15 種類の薬剤などより多くの化合物の血中濃度測定も同様に応用で

きる可能性がある。

第三に、1点検量線を用いた絶対検量線法は、院内の血中濃度測定に十分な性能を示した。一般にHPLCによる定量は精度が重要であるため、多点検量線による内標準法を用いることが多い。しかし、本手法は、すべての薬物について内標準物質（IS）を選定することは現実的ではないと考えた。さらに、検量線作成に用いる標準液は、臨床においては取り扱いが容易であることが重要である。本研究では、1点検量線を用いて定量バリデーションを行ったが、定量値の真度、繰り返し精度、中間精度に異常は認めなかった（Table 2-4）。一方で、日常業務における精度管理を容易に行うためには、検量線の作成に標準物質（standard reference material: SRM）が必要である。そのため、将来的にはメーカーによる品質を保証されたSRMの開発および認証が望まれる。

さて、本法により現在外注している項目を院内測定に切り替えることが可能になる。例えば、当院においては今回検討したVRCZやLTGは外注項目であったが、本法に切り替えることができた。VRCZの血中濃度分析には、HPLC-MS/MSやHPLC-UVを用いた研究が多く⁶⁶⁻⁷²⁾、LTG⁷³⁻⁷⁸⁾やミコフェノール酸⁷⁹⁾、イマチニブ⁸⁰⁾もHPLC-UVで測定できる報告がある。しかし、これらの分析システムは他の多くの薬剤の血中濃度も測定するための拡張性は備えていない。本HPLC-UVプラットフォームは、VRCZやLTGの血中濃度測定に使用でき、第1章で示したミコフェノール酸やイマチニブにも拡張可能であり、外注項目に対する高い汎用性が期待される。

本HPLC-UVプラットフォームは、多くの市中病院などが比較的安価な装置で導入でき、多品目の薬物血中濃度の定量分析が実施できることをコンセプトとしている。日本の臨床分析において分析コストは重要なファクターであり、臨床的意義と検査費用等を総合的に考慮した上で、院内での測定項目が決定される。そのため、測定コストのかかるHPLC-MS/MSなどは多くの一般病院では導入することができない。本法は、前処理カラムと分析カラムにモノリスカラムを用いているため、ここには比較的成本を割いているが、基本的には一般的なHPLC-UV法として設計したため、一般病院でも導入可能な費用になると推算している。院内の薬物血中濃度を十分に測定できない病院においては、本プラットフォームを導入することにより、分析可能な薬剤数が増加し、TDM業務の拡大が期待される。このようなTDM業務の推進により特定薬剤管理料などの診療報酬が得られる病院経営的なメリットもあるが、TDMによって得られる健康面や医療経済的メリットもある。近年、神経精神薬理学において、薬物治療の有効性と安全性を高め、医療費を削減するためにTDMが利用されている⁸¹⁾。また、イマチニブによる薬物治療においても、TDMは費用対効果の高い介入である可能性が示唆されている^{82, 83)}。本手法によってTDMの運用が拡大すれば、その費用対効果を示すさらなるエビデンスが得られるかもしれない。当院においても本法を用いた医療経済的評価を行う価値があると考えている。

さらに近年、抗菌薬（リネゾリド、テイコプラニン、VCM、VRCZなど）を処方さ

れた重症患者に対して、定期的な TDM の実施が推奨されている⁸⁴⁾。このような抗菌薬の血中濃度分析には、HPLC-UV が LC-MS/MS の専門知識を持たない施設にも適しているという報告がある⁸⁵⁾。また、 β -ラクタム系抗菌薬の血中濃度分析に HPLC-UV 法を用いた報告も複数挙げられる^{46, 47, 86, 87)}。本 HPLC-UV プラットフォームは、抗菌薬の中では VCM と VRCZ にのみに現在は適用されているが、将来的には他の抗菌薬にも適用拡大することが期待される。

今後は、本 HPLC-UV プラットフォームの応用範囲をさらに広げ、病院における TDM の運用や医療の質の向上に貢献していきたいと考える。

2.5 小括

本章では、第1章で構築した薬物定量分析システムについて、さらに病院内で患者血清を使用する実臨床での実用性と性能評価を行った。

被検薬物には、カルバマゼピン、フェニトイン、バンコマイシン、ラモトリギン、ポリコナゾールを用いた。薬物血中濃度の定量は第1章の手順と同様に行ったが、患者血清の遠心用スピナーカートリッジの通液性を考慮して、遠心時間や血清添加前にメンブランフィルターを用いる点を改良した。また、本法以外の血中濃度定量法として、通常業務として院内の自動分析装置 (cobas®) による測定と外注 (HPLC-MS/MS) による測定も同時に行い、本法で得た薬物定量値と cobas および HPLC-MS/MS での検査結果を比較評価した。

本 HPLC-UV 法を用いたいずれのクロマトグラムもピーク形状はシャープであり、極端なテーリングやリーディング、ショルダーピーク、ピーク割れ等の異常は見られず、3分以内に速やかに分離検出できた。また、臨床検査技師や薬剤師が1回10分程度で前処理を行うことができ、繰り返し精度は良好であった。さらに、本法と既存手法 (cobas, HPLC/MS/MS) について、Passing-Bablok 回帰分析および Bland-Altman 分析を行い、定量値の相関性は良好であった。本法は、熟練を要せずに実用可能な HPLC-UV プラットフォームであり、院内での TDM 業務における多品目の薬物血中濃度測定への利用が期待される。

以上から、本法は特別な分析技術を必要とせずに実施可能であり、院内での TDM 業務における多品目の薬物血中濃度測定への利用が期待される。本章では第1章で示した15品目以外では VCM の測定も可能であることを示したが、それ以外の項目も拡張可能かどうかは示していない。そのため、本プラットフォームが他の薬剤においても拡張性があるかどうかを検証する必要がある。第3章では2020年2月から世界的流行となった COVID-19 の治療候補薬として使用されたファビピラビルについて適応可能かどうか検討を行った。

第3章 HPLC-UV プラットフォームによるファビピラビル血中濃度の院内迅速定量法の開発

3.1 緒言

人類は太古から様々な感染症とたたかってきた。天然痘，ペスト，コレラなど疫病の発生によって多くの人々が死亡した記録が残っている⁸⁸⁾。19世紀後半から20世紀にかけて，細菌学や免疫学などが発展することで，感染症をもたらす病原体や対処方法が判明し，またワクチンや抗菌薬・抗ウイルス薬が開発されるようになった。しかし，21世紀になってもなお新規感染症が出現し，我々人類の脅威となっている。2002年のSARS（重症急性呼吸器症候群），2009年の新型インフルエンザ（A/H1N1），2012年の中東呼吸器症候群（MERS）が報告されている⁸⁹⁾。

そして2019年12月，中国・湖北省武漢市で発生した原因不明の肺炎が，新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）であることが判明した⁸⁹⁾。WHOはこの新型コロナウイルス感染症（COVID-19）を2020年3月11日にパンデミックと表明し，その後2023年3月現時点においても世界的に流行し続けている。パンデミック初期は，多くの患者は発症から1週間程度で治癒に向かう一方で，一部の患者は下気道まで感染が進展し，酸素療法や人工呼吸器管理を必要とする患者も多くいた。そのため，COVID-19の治療薬の早期開発が急務とされ，いくつかの薬剤の臨床試験が開始された⁹⁰⁾。ファビピラビルはその薬剤の一つであり，本邦では観察研究に参加することで使用が可能となった。ファビピラビル（FPV）は，RNA依存性RNAポリメラーゼ阻害剤で，日本では新型インフルエンザの治療薬として承認されている⁹¹⁻⁹³⁾。FPVは血中濃度に応じて標的ウイルスの増殖を抑制するため，標的ウイルスによって投与量の検討が必要になる^{94, 95)}。さらに，FPVは他の医薬品との相互作用が報告されている⁹⁶⁾。したがって，COVID-19の薬物治療にFPVを使用する際には，FPVの血中濃度の治療モニタリングが非常に重要であり，ヒト血漿（または血清）中のFPVを迅速かつ正確に定量する分析法が緊急に必要であると考えた。

本章では，第1～2章で構築したHPLC-UVプラットフォームを用いて，血清中のFPVの簡易・迅速定量法を構築した。

3.2 方法

3.2.1 試薬

アセトニトリル(CH_3CN ; HPLC 用), リン酸 (特級), 5 mol/L 塩酸は関東化学製を使用し, 超純水は, Mili-Q Reference-A+ (Millipore SAS, France) で製造したものを使用した. また, FPV は, MedChemExpress から購入し, ヒト標準血清 (NHS) は, 和光純薬工業から購入した.

3.2.2 UV-VIS 分光分析

まず FPV 1 mg を水 1 mL に溶解して FPV の原液 (1 mg/mL) を調製した. UV-VIS 分光用の FPV の試験溶液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は, その調整液を 5 v/v% の CH_3CN を含む水溶液 (0.1% リン酸緩衝液, pH2 または pH7) で 50 倍に希釈して調製した. 試験溶液の UV-VIS 吸収スペクトルは, UV-1800 分光光度計 (島津製作所) で 200~450 nm の範囲で記録した.

3.2.3 SPE および HPLC 分析用 FPV 試験液の調製

SPE および HPLC 条件の最適化に用いるため, 原液 (1 mg/mL) を任意の水溶液または正常ヒト血清で 20 倍に希釈し, FPV 試験液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を調製した. また, FPV 添加血清 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 検量線作成用) および FPV 添加血清 (5, 20, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 本定量法のバリデーション用の QC) を NHS で希釈した溶液を調製した.

3.2.4 SPE カートリッジと前処理条件

FPV の HPLC 分析前の SPE 処理には, 第 1, 2 章と同様に MonoSpin C18 を選択した. MonoSpin カートリッジは, 使用前に CH_3CN と水をそれぞれ 500 μL ずつ順次通過させて前処理を行った. Centrifuge 5415R を用いて 5,000 rpm (2,300 \times g) で 1 分間遠心分離し, 各溶液をカートリッジに通液した. SPE による前処理の詳細は以下の通りである.

- 1) FPV 試験溶液または FPV スパイク血清 (150 μL) に 5 M HCl (6 μL) を添加した.
- 2) 5 秒間ボルテックスで混合した後, 混合液の 1/3 量 (52 μL) を MonoSpin カートリッジに通液した.
- 3) 水 (500 μL ; 洗浄液), 10% CH_3CN 水溶液 (150 μL ; FPV 溶出液) を順次カートリッジに通し, FPV を含む最終溶出液を試験管に採取して HPLC 分析に使用した.

3.2.5 HPLC 装置と分析条件

本実験の HPLC システムとして, 日立ハイテクサイエンス製の高速液体クロマトグ

ラフ Chromaster (装置構成：5310 カラムオープン, 5210 オートサンプラー, 5110 送液ポンプ, 5430 ダイオードアレイ検出器)を使用した。分離カラムは, Merck 製の ODS モノリスカラムである Chromolith HighResolution RP-18 endcapped (100 mm×4.6 mm I.D.) に同 guard column (5 mm×4.6 mm I.D.) を接続して, 逆相分配モードで使用した。FPV を含む分析対象物 (注入量：20 μ L) を移動相溶媒 (0.1%リン酸および CH₃CN, 95 : 5, v/v) により 2 mL/min の流速で溶出し, 溶出液中の FPV を 325 nm の紫外線吸収により検出した。

3.2.6 分析法バリデーション

FPV 添加血清 (100 μ g/mL) の SPE 溶出液の HPLC データから, FPV の HPLC 定量用に 1 点検量線を作成した。FPV 添加血清 (5 μ g/mL) の SPE 溶出液のクロマトグラムから FPV の LOD および LOQ をそれぞれ 3 : 1 および 10 : 1 の S/N 比で算出した。

併行精度 (repeatability) は QC 試料 (5, 20, 80 μ g/mL の FPV を添加した血清) を同日に 4 回分析し, 室内再現精度 (intermediate precision) は QC 試料を 3 日に分けて 1 回分析することにより実施した。真度 (accuracy; %) は, 測定値/理論値×100 で算出した。併行精度 (repeatability; RSD%) は, 相対変動係数 (CV) として, 標準偏差/測定濃度の平均値×100 で算出した。特異性は, ブランク血清を分析し, そのクロマトグラムを対応する FPV を添加した血清試料と比較することにより評価した。

3.2.7 患者検体の測定

本法が患者血清においても適用可能かどうかを評価するため, FPV による治療を受けた COVID-19 患者 4 名の血清試料を使用した。本研究実施計画は, 北信総合病院の倫理委員会により承認されている (受付番号：2020005)。なお, FPV の薬剤提供は, 厚生労働科学研究費等において行われる観察研究の枠組みの中で行われ, 別途, 当該研究への参加等の手続きを行っており, 治療開始に先立ち, 医師から患者又はその家族等に有効性及び危険性 (胎児への曝露の危険性を含む) を十分に文書にて説明し, 患者又はその家族等から文書での同意を得てから投与を開始している。

血中 FPV 濃度測定に用いた血清試料は, 生化学検査等のために朝に採血した血清の残余血清を使用した。ただし, 使用する血清は, いずれも FPV の経口投与前 (トラフ値) のものを使用した。患者血清は凍結保存し, 1 ヶ月以内に測定した (別途, その保存方法と期間において FPV の安定性を確認している)。

患者血清は DISMIC 13HP シリンジフィルター (0.45 μ m, ADVANTEC) でろ過し, 各ろ過試料 (5 mol/L HCl 添加後) を MonoSpin C18 カートリッジに通液し, 3 分間遠心分離を行った。その後の SPE プロトコルは 3.2.4 と同じである。

3.2.8 金属イオンと FPV の複合体形成スクリーニング法

FPV と錯体を形成する金属イオンを同定するために, MonoSpin カートリッジを用

いたスクリーニング法を適用し、12種類の金属イオンがそれぞれFPVと錯体形成するかどうかを先行研究と同様の手順で検討した⁹⁷⁾。本手法の手順を下記に示す。

3.2.8.1 HPLC 装置と分析条件

試験液中のFPVの定量には、逆相HPLCシステム（日立ハイテクサイエンス製）を使用した。装置は、L-7100ポンプ、L-2200オートサンプラー、L-7455ダイオードアレイ検出器から構成されている。固定相には、ガードカラム（内径5×4.6mm）付きChromolith HighResolution RP-18カラム（100×4.6 mm I. D., Merck, Darmstadt, Germany）を使用した。

FPVを含む分析物（注入量：20 μL）を移動相溶媒（0.1%リン酸とCH₃CN, 95 : 5, v/v）で2 mL/minの流速で送液し、溶出液中のFPVを325 nmのUV吸収により検出した。

3.2.8.2 SPE カートリッジにキレートさせた各金属イオンに対するFPVの吸着容量(%)の測定

本検討は既報⁹⁷⁾の手段を参考として、MonoSpin ME カートリッジ（ジーエルサイエンス製）を用いる改良法として実施した。MonoSpin ME カートリッジのモノリス型シリカディスクの表面は、イミノ二酢酸（IDA）官能基で修飾されている。具体的な実験手順は以下の1)～7)のとおりである。

- 1) 溶液は、Centrifuge 5415R（Eppendorf, Hamburg, Germany）を用いて5,000 rpm（2,300 ×g）1分間の遠心分離を行い、MEカートリッジに通過させた。
- 2) MEカートリッジは、200 μLの1M硝酸と200 μLの100 mM酢酸アンモニウム緩衝液（pH5.5）を順次通過させて前処理を行い、カートリッジ上のME部位をコンディショニングした。
- 3) MEカートリッジを用いた金属イオンとFPVの錯形成に関するスクリーニング方法の概略をFig3-1に示す。
- 4) 前処理後、金属イオンの試験溶液（500 μL, 1000 μg/mL）をMEカートリッジに通液し、金属キレートカートリッジを水500 μLで洗浄した。
- 5) その後、FPVの試験溶液（200 μL, 20 μg/mL）を金属キレート付きMEカートリッジに通し、溶出液を回収してHPLC分析に供した。
- 6) 逆相HPLC分析により、溶出液中および試験溶液中のFPVの量（クロマトグラム上のピーク面積（PA））を測定した。
- 7) 金属キレートMEカートリッジに対するFPVの吸着容量（Q, %）は、式（1）を用いて算出した。

$$Q = (1 - PA_{ME}/PA_{STD}) \times 100 \quad (1)$$

3.3 結果

3.3.1 HPLC 条件の最適化

FPV は pKa (5.1) 以下の酸性条件下では疎水性の非イオン化状態で存在し、ODS (C₁₈) カラムに良好に保持することが確認できた (Fig. 3-1). Fig. 3-2 の UV スペクトルに示すように、5% CH₃CN を含む酸性 (pH 2) の移動相溶媒中では FPV の λ_{\max} は 325 nm であった. このため、HPLC システムの検出波長は 325 nm とした. この条件下で、Fig. 3-1-a に示すように、FPV の良好な RP-HPLC プロファイル (3 分以内に溶出) が得られた.

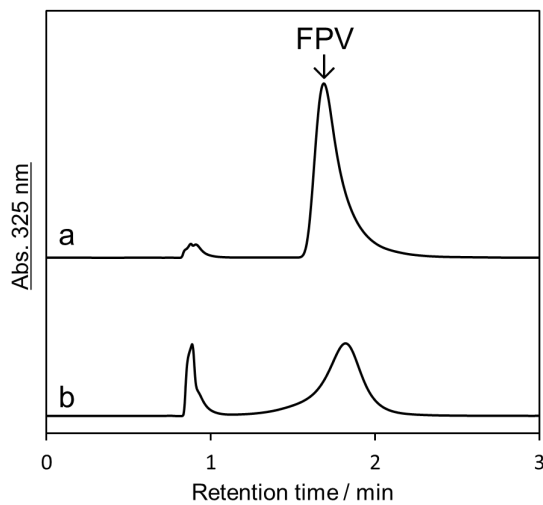


Fig. 3-1 Comparison of reversed-phase (RP) HPLC separation of FPV was performed on a ODS (C₁₈) column. a) the mobile phase was the acidic pH 2 mobile-phase solvent containing 5% CH₃CN. b) the mobile phase was the pH 5 mobile-phase solvent containing 5% CH₃CN.

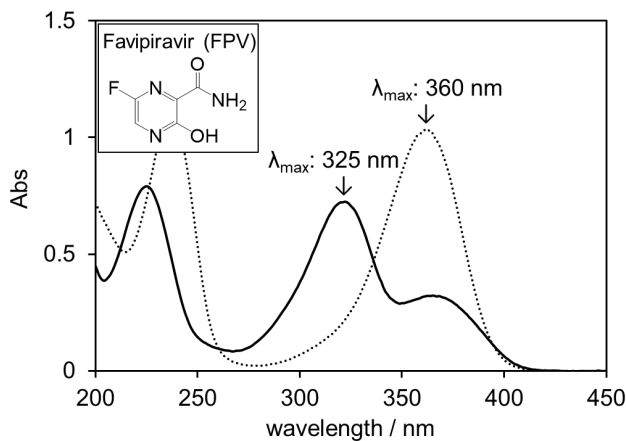


Fig. 3-2 Comparison of the UV spectra of FPV under different pH conditions. The solid line indicates the spectrum in the acidic (pH 2) solvent containing 5% CH₃CN. The dotted line indicates the spectrum in neutral (pH 7) solvent containing 5% CH₃CN.

3.3.2 SPE 条件の最適化

FPV を添加した血清を HPLC で定量する前の SPE 条件を最適化した. MonoSpin カートリッジ (C₁₈, C₁₈-AX, C₁₈-CX) のうち、C₁₈ カートリッジは酸性 pH 条件下で FPV に対する吸着率が最も高く、カートリッジへの最適な注入量は 50 μ L だった (Table 3-1). さらに、C₁₈ カートリッジに吸着した FPV を、洗浄工程を省略して 10% CH₃CN

(150 μL) で直接溶出した場合、血清からの FPV の SPE 回収率 (%) が最も高かった (Table 3-1). これらのデータを基に、FPV を添加した血清の SPE に最適なプロトコルを考案し、上記の「3.2.4 SPE カートリッジと前処理条件」に記載した.

Table 3-1 Comparison of SPE conditions for sample solution of FPV.

Test No.	Sample solution	SPE conditions				Adsorption % of FPV to cartridge	Recovery % of FPV from serum
		MonoSpin cartridge	Applied vol. (μl) of sample soln.	Wash-up soln. (0.01M HCl, ml)	Eluate (10% CH_3CN , ml)		
1-1	FPV test soln. (50 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) in PBS (pH 7.4)	C18	150	-	-	31	-
1-2		C18-AX	150	-	-	30	-
1-3		C18-CX	150	-	-	11	-
2-1	FPV test soln. (50 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) in 0.01M HCl	C18	150	-	-	68	-
2-2		C18-AX	150	-	-	44	-
2-3		C18-CX	150	-	-	42	-
3-1	FPV test soln. (50 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) in 0.01M HCl		50	-	-	92	-
3-2		C18	100	-	-	71	-
3-3 (2-1)			150	-	-	68	-
4-1	FPV test soln. (50 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) in 0.01M HCl	C18	150	150	150	-	17
4-2			150	-	150	-	70
5-1	Mixture (150 μl + 6 μl) of FPV-spiked serum (50 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) and 5M HCl	C18	52		150		83
5-2			156		150		55

3.3.3 FPV 定量の最適化

上記 3.3.2 の SPE による前処理とその後の RP-HPLC/UV 分析を組み合わせることで、血清中の FPV を定量する分析手順を確立した. 手順を Fig. 3-3 に模式的に示す. また、FPV を添加した血清 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の SPE 溶出液の HPLC クロマトグラムを Fig. 3-4 に示す. (FPV を含まない) ブランク血清のクロマトグラム (Fig. 3-4-c) と比較して、FPV 添加血清は FPV の保持時間に対応する血清成分由来の干渉ピークを示さなかった (Fig. 3-4-b). また、Fig. 3-4-b と Fig. 3-4-a (FPV 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の FPV ピーク面積を比較すると、血清からの SPE 回収率は約 83% ($n=4$, CV: 2.2%) であった. また、FPV の LOD および LOQ は、それぞれ 0.773 および 2.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった.

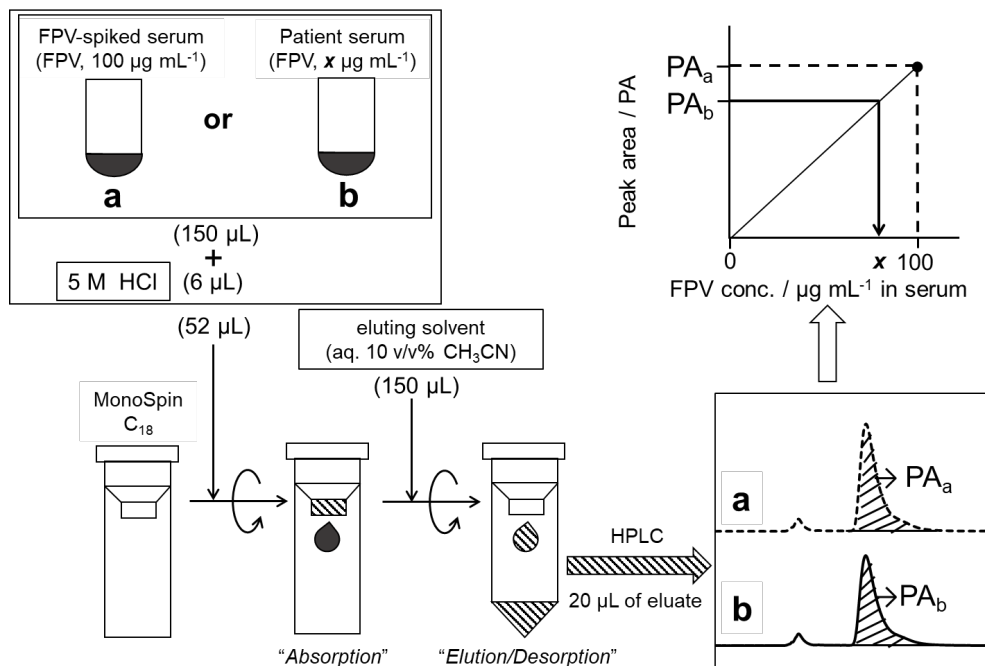


Fig. 3-3 Schematic procedure of the present method for quantification of serum favipiravir (FPV) level by appropriate combination of a solid-phase extraction (SPE) treatment and a subsequent RP-HPLC/UV detection system.

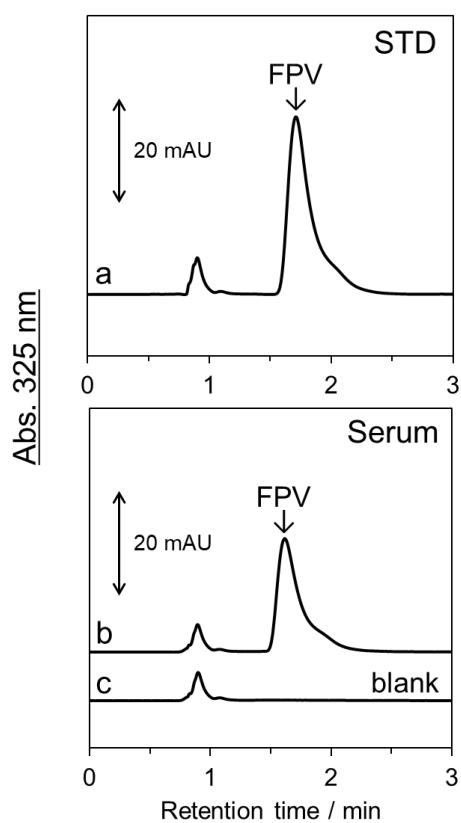


Fig. 3-4 Comparison of RP-HPLC chromatograms of the SPE eluate of sera spiked with or without FPV. a) FPV test solution (50 µg/mL, untreated); b) SPE eluate of FPV-spiked serum (50 µg/mL); c) SPE eluate of blank (FPV-free) serum.

3.3.4 分析法バリデーション

これらの結果に基づき，FPV を添加した血清（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の SPE 溶出液の FPV ピーク面積から作成した 1 点検量線を用いて，上記方法により血清中の FPV の定量を実施したところ，FPV の定量性は良好であった．Table 3-2 に 5, 20, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の FPV 濃度に調製した血清（QC）を用いたバリデーションの結果に示した．すべての QC で精度値は 97.9 ~ 105.0% となった（Table 3-2）．日内および日間精度（CV%）は，試験した 3 つの濃度で 6%未満であった．すべての QC において，真度と精度の許容基準を満たすことが確認された．

Table 3-2 Accuracy and precision of the present quantification method for FPV.

Conc. In serum / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Accuracy, %	Repeatability / CV %	Intermediate precision / CV %
5	105.0	1.0	2.4
20	103.4	4.0	2.4
80	97.9	5.5	1.8

The accuracy (%) was calculated from the data of quadruplicate samples ($n=4$) at a given concentration. The repeatability (CV %) was also from quadruplicate samples ($n=4$). The intermediate precision (CV %) was calculated over a series of three analyses on different days (3 days).

3.3.5 患者検体の測定

本法の臨床的有用性を検証する目的で，FPV 投与による治療を受けた COVID-19 患者 4 名の血清中の FPV 濃度を定量化した．4 人の血清中の FPV 濃度は，2.7, 33.1, 77.6, 93.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された（定量分析法の HPLC クロマトグラムは Fig. 3-5 に示す）．

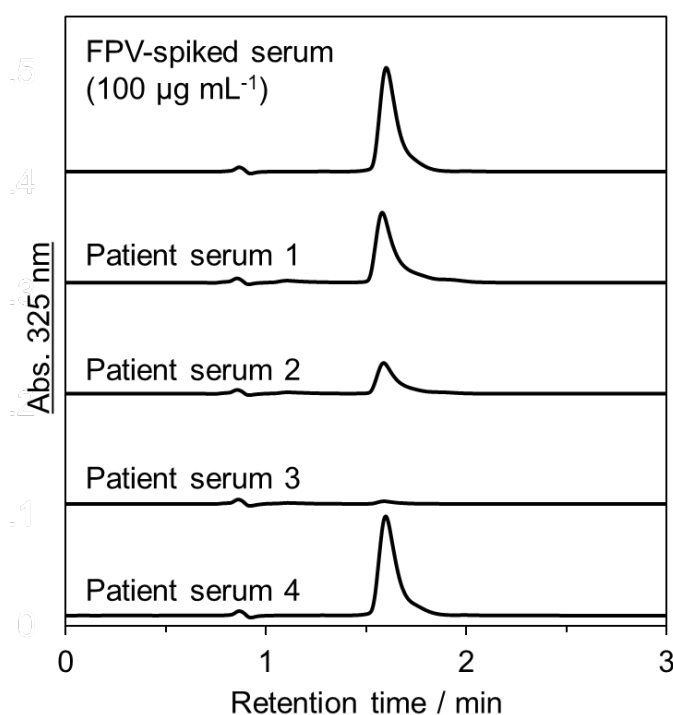


Fig. 3-5 Comparison of reversed-phase HPLC chromatograms of the SPE eluate of calibration sample and patient samples.

3.3.6 SPE カートリッジにキレートさせた各金属イオンに対する FPV の吸着割合

FPV は典型的な多座配位子構造を有することから、FPV と錯体を形成する金属イオンの存在について検討した。Fig. 3-6 に示すように、FPV は 12 種類の金属イオンのうち、第二鉄 (Fe^{3+}) および銅 (Cu^{2+}) と選択的に錯体を形成することが明らかになった。

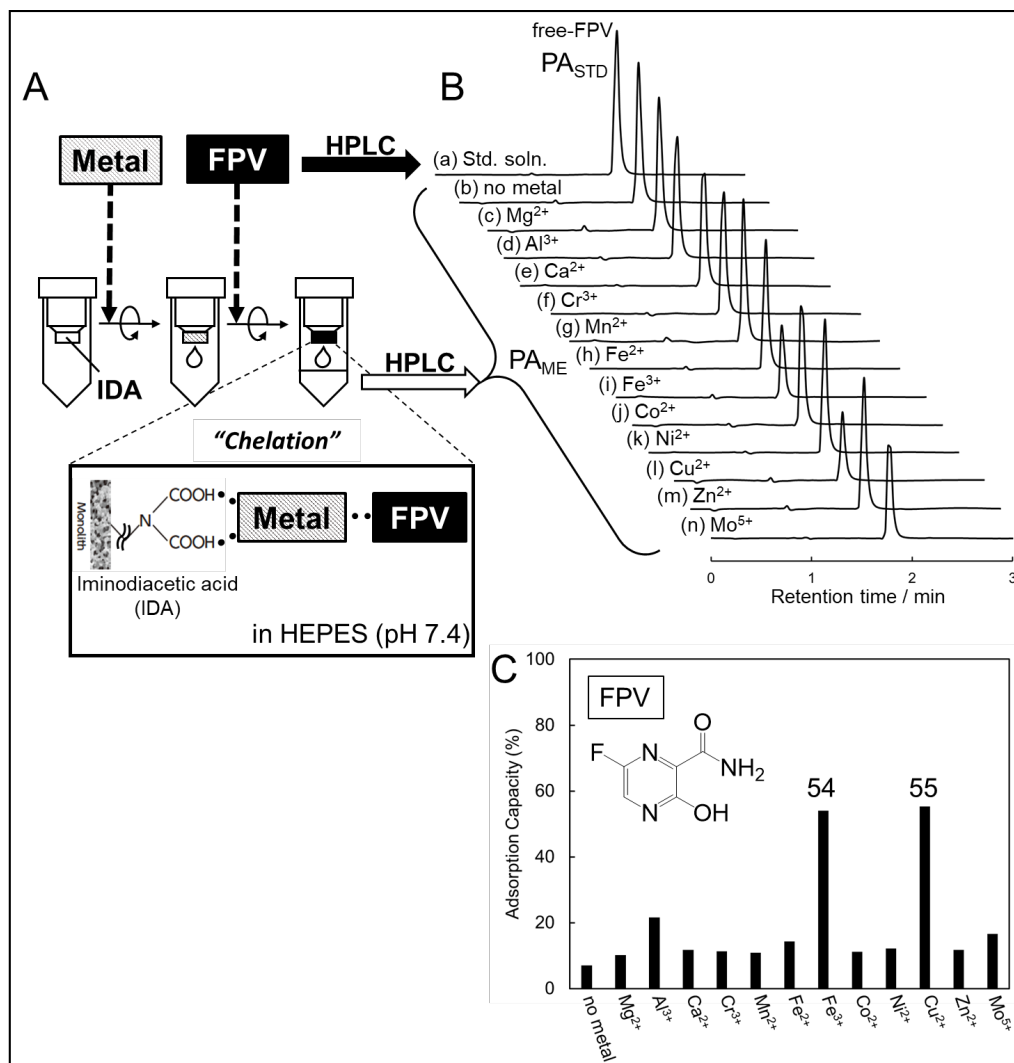


Fig. 3-6 (A) Schematic showing screening method for complex formation between a metal ion and FPV on a ME cartridge. (B) HPLC stacked chromatograms of FPV in the eluates after passing the FPV test solution through the ME cartridge. a) Chromatogram of FPV in the test solution before passing through the ME cartridge; b) after passing through the bare ME cartridge; c) ~ n) after passing through each of twelve different metal-chelated ME cartridges: c) Mg^{2+} , d) Al^{3+} , e) Ca^{2+} , f) Cr^{3+} , g) Mn^{2+} , h) Fe^{2+} , i) Fe^{3+} , j) Co^{2+} , k) Ni^{2+} , l) Cu^{2+} , m) Zn^{2+} n) Mo^{5+} . (C) Comparison of the adsorption capacity (%) of FPV to each of twelve different metal ions chelated onto the ME cartridge.

3.4 考察

本報告前の 10 年間に、血漿または血清中の FPV 濃度を HPLC で定量する方法について記述された 9 つの論文が発表されている^{94-95, 98-104}。しかしながら、Table 3-3 に示すように、これらの論文の多くは、分析手順やクロマトグラムの詳細な記述が欠如している。また、患者検体においても同様に測定できるかどうかを評価することは臨床応用する上で重要である。本章で示した方法は、COVID-19 による FPV 薬物療法を受けた患者の検体から、血清 FPV 濃度を迅速に定量できる方法として有用であると考える。

興味深いことに、今回測定した 4 名の患者は同じ FPV の投与量を投与されたにも関わらず、血清 FPV 濃度（トラフ値）は 30 倍以上の幅を認めた。最も低い例は FPV 血中濃度 2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 3-5 の Patient serum 3) であったが、これは重症 COVID-19 患者において FPV 血中濃度が低値であったという国内報告⁹⁾があり、刮目に値すると考える。FPV の臨床試験における健康な被験者の血中濃度と比較しても顕著に低濃度であるため、このような患者では FPV の効果が十分に得られない可能性が推察されるとともに異常に低値となる理由についても解明すべき課題である。

本章では、FPV が金属イオンと複合体を形成することも初めて示した。本研究の FPV は第二鉄 (Fe^{3+}) と選択的に錯体を形成するため、例えば、溶性ピロリン酸第二鉄（インクレミン[®]）や含糖酸化鉄（フェジン[®]）、カルボキシマルトース第二鉄（フェインジェクト[®]）との相互作用に注意する必要がある。同じ手順で行った先行研究⁹⁷⁾における LVFX と Fe^{3+} の吸着率が 50% であったのに対して、本研究における FPV と Fe^{3+} の吸着率が 54% であったことから臨床的にも注意すべき相互作用と考える。さらに血清中の鉄貯蔵タンパク質であるフェリチン濃度との関連性についても検討の価値がある。そのため、次の第 4 章では、COVID-19 患者におけるファビピラビル血中濃度の増減に影響を及ぼす因子について探索研究を実施した。

Table 3-3 Comparison of the previously reported methods and our proposed method for HPLC quantification of plasma/serum level of FPV.

Ref.	Sample (plasma:P) (serum:S)	Pretreatment method	Reversed-phase HPLC conditions					Validation for FPV quantitation	
			Column	Solvent	Detection	Chromatogram	RT* ¹ (min)	Cal. Range* ² (µg/mL)	LOQ * ³ (µg/mL)
94	P	not described (n.d.)	C18	n.d.	UV MS	not shown (n.s.)	n.d.	n.d.	0.1 5
95	P or S	SPE* ⁴ (by Oasis MAX), and dry-up by evaporation	C18	aq.MeOH (5-58%, pH 7)	UV (360 nm)	n.s.	21	1-50	n.d.
98	P	DP* ⁵ by MeOH/CH ₃ CN	C18	aq.CH ₃ CN (1%, pH 6.5)	UV (360 nm)	n.s.	n.d.	1-100	n.d.
99	S	n.d.	n.d.		UV (?)	n.s.	n.d.	1-100	1.0
100	P	DP by CH ₃ CN	SB-Aq	aq.CH ₃ CN (25%, pH 2.5)	UV (322 nm)	n.s.	n.d.	n.d.	n.d.
101	S	SPE (by Oasis MAX), and dry-up by evaporation	C18	aq.CH ₃ CN (5-40%)	MS	n.s.	n.d.	0.002-0.3	0.01
102	P	DP by CH ₃ CN	n.d.	n.d.	MS	n.s.	n.d.	0.5-100	0.1
103	P				(all methods were quoted from ref.102)				
104	P				(all methods were quoted from refs 94 and 95)				
Proposed method	S	HCl addition, and SPE (by MonoSpin C18)	C18	aq.CH ₃ CN (5%, pH 2 >)	UV (325 nm)	(see, Fig.3-3)	3	-100	2.6

*1 Require time (for HPLC)

*2 Calibration range

*3 Limit of quantification.

*4 Solid-phase extraction.

*5 Deproteinination (*i.e.* protein precipitant (organic solvent) addition).

3.5 小括

2020年3月からのCOVID-19のパンデミックでは、ファビピラビル（FPV）が治療候補薬の1つとして注目された。しかしながら、COVID-19患者に対するFPVの薬物動態データは不足しており、病院内での迅速な血中濃度の定量法も確立されていなかった。そこで、COVID-19患者を受け入れている市中病院を想定し、FPVの血中濃度定量法を検討した。具体的には第1章と第2章で構築したSPEによる前処理と逆相HPLC-UV検出システムを組合せる本法を適用した。また、多座配位子構造を有するFPVと選択的に錯形成する金属イオン種についても調べた。

FPVは、酸性pH条件下でODS基に保持・吸着し、FPV添加血清に5M塩酸を加えてからMonoSpin C18カートリッジに通液した。吸着したFPVを（洗浄を省略して）10%CH₃CN水溶液で直接溶出した時に、SPE回収率が最大となった。このSPE処理と逆相HPLC分析を組合せて、定量バリデーションを行った結果、日内・日間の真度、精度のいずれも良好であった。この手法を用いて、同量のFPVを経口投与したCOVID-19の患者（4名）の血清中FPV濃度（トラフ値）を定量した結果、2.7~93.5 μg/mLの範囲で大きな個人差を認めた。一方で、FPVはFe³⁺およびCu²⁺と選択的に錯形成したため、これらの金属イオンの関与する内在性因子と血中FPV濃度の関連が示唆された。

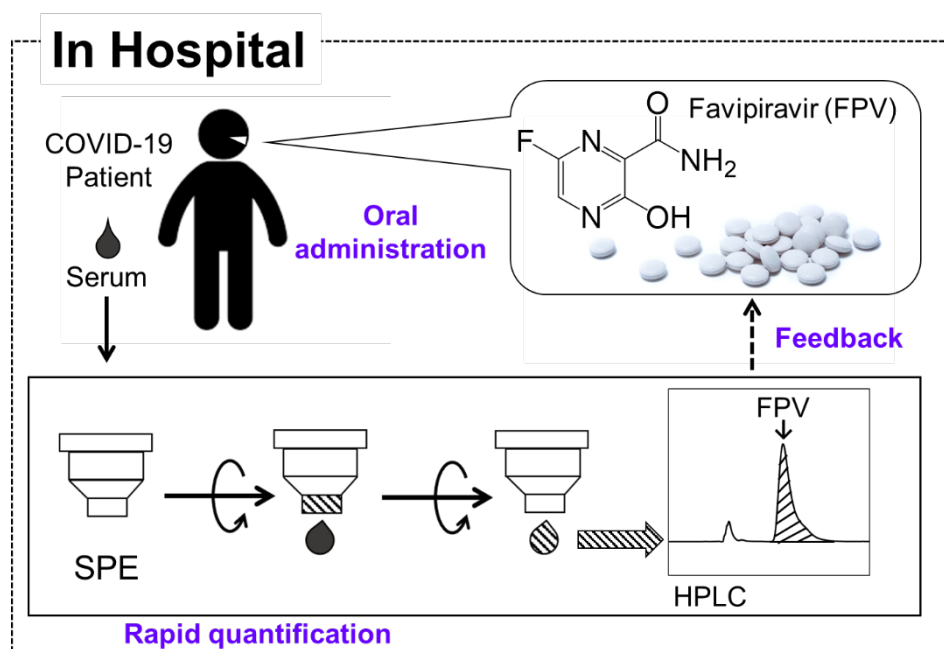


Fig. 3-7 The graphical index of this chapter.

第 4 章 COVID-19 患者におけるファビピラビル血中濃度の増減に影響を及ぼす因子の探索

4.1 緒言

2020 年 3 月から新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) のパンデミックが始まり、パンデミック早期から COVID-19 ワクチンおよび治療薬の開発が急務となった⁹⁰⁾。ファビピラビル (FPV) は、新型インフルエンザ治療薬として国内承認された薬剤で、COVID-19 の原因ウイルスである SARS-CoV-2 に対する増殖抑制活性を示すため、その治療候補薬として注目を集めた。そして、COVID-19 の治療において FPV の効果を検証する臨床試験が日本を含む多くの国で実施され、発熱の低下などの臨床結果が有意に改善した報告があった¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾。また、ロシアで実施された COVID-19 患者に対する FPV の非無作為化試験の中間報告では、5 日までのウイルス陰性化率が FPV 投与群 (62.5%) は非投与群 (30.0%) に比べ有意に高いと報告された¹⁰⁸⁾。一方で、FPV の臨床的有用性が認められないという矛盾した報告も発表されており^{109, 110)}、重症 COVID-19 患者において血中 FPV 濃度が異常に低いとする報告もあった⁹⁹⁾。そのため、COVID-19 に対する FPV の適応拡大については慎重に検討された。

FPV の薬物動態は複雑で、用量および経時的に非線形性を示し、1 回目と 2 回目の投与の間に薬物濃度が著しく増加し、その後投与期間の終わりまで徐々に減少する⁹⁴⁾。エボラ出血熱に対する臨床試験では、血中 FPV 濃度が予想よりも低かったという報告がある⁹⁵⁾。また、重症インフルエンザに対する FPV の臨床試験では、血中 FPV 濃度 (トラフ値) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の達成率は 50% 未満であったと報告されている¹¹¹⁾。血中 FPV 濃度が目標よりも低いことは、エボラ出血熱やインフルエンザの患者に対して十分な薬効を示すことができない可能性が推察される。さらに、COVID-19 の治療における FPV の薬物動態学的・薬力学的データは不足しており、COVID-19 患者における血中 FPV 濃度の測定とそこから得られるデータの蓄積は、この適応症における FPV の有効性と安全性を評価するために非常に重要であると考えられる¹¹²⁾。

血中 FPV 濃度のデータを収集するために、第 3 章において、COVID-19 患者の血中 FPV 濃度を迅速かつ院内で定量する方法を開発した。この方法は、SPE による前処理と HPLC による分離・検出から構成されている。本章では、この手法を用いて、当院に入院した COVID-19 患者で FPV 投与した患者の残余血清から血中 FPV 濃度を測定して、その増減に影響を及ぼす因子の探索研究を企図した。

ただし、多変量解析において説明変数の数が多くなると、関連性を検証するのに多くの患者の血中濃度データが必要になり、また得られた結果の信頼性が低下し、解釈も困難となってしまう。当院で予想される患者数も考慮して、血中濃度に依存する可能性のある因子を事前に検討した。その一つがフェリチンである。第 3 章の研究において、FPV は鉄イオン (Fe^{3+}) および銅イオン (Cu^{2+}) と選択的に錯体を形成することが分かった。フェリチン複合体は 1 個当たり 4500 個の鉄(III)イオン (Fe^{3+}) を貯蔵可

能であり，血中 FPV 濃度は血清フェリチン濃度と関連がある可能性があるとして推測した¹¹³⁾。また，フェリチンは急性期タンパク質として知られており，炎症や外傷，腫瘍などの組織破壊がある場合，血中フェリチンは高値を示す¹¹⁴⁾。これは炎症などによりマクロファージが刺激されると，活性化マクロファージが鉄の取り込みを促進し，フェリチン合成が促進するという機序である。さらに，重症 COVID-19 患者が高フェリチン血症を示す報告¹¹⁵⁾があり，その関連性を検証する価値がある。

もう一つの因子として尿酸が挙げられる。高尿酸血症は，FPV 治療の代表的な副作用として知られている。FPV は主にアルデヒドオキシダーゼ (AO)，一部はキサントキシダーゼ (XO) により代謝され，水酸化体の不活性代謝物 M1 となり，尿中に排泄される。FPV と M1 は腎臓での尿酸排泄に関与する有機アニオントランスポーター 1 と 3 (OAT1 と OAT3) の中程度の阻害剤として機能し，さらに M1 は尿酸トランスポーター (URAT1) を介して尿酸の再取り込みを強化する。そのため，FPV は尿中への尿酸排泄を減少させ，血中尿酸値を上昇させる。血中 FPV 濃度と尿酸値上昇との関連性については報告がなく，検討の価値があると考えた。

以上の背景から，当院に入院中の COVID-19 患者の血中（血清）FPV の増減に影響を及ぼす因子について，レトロスペクティブに検討を行った。

4.2 方法

4.2.1 患者

2020年4月1日～12月31日に当院でFPV治療を受けたCOVID-19患者27例を登録した。本研究は、当院の倫理委員会の承認を得て実施した（受付番号：2021002）。患者の血中FPV濃度は、当院での検査時に採取した残余血清を用いて測定した。また、本研究は、全ての研究対象者（患者またはその家族）に十分な説明を行い、研究対象者から同意を得て実施した。本研究は個人情報の保護に十分配慮し、人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（文部科学省/厚生労働省/経済産業省告示第1号，2021年3月23日）に基づいて行った。

4.2.2 試薬

FPVはMedChemExpressから購入した。ヒト標準血清（NHS）は、富士フイルム和光純薬から購入した。アセトニトリル（CH₃CN；HPLCグレード）、リン酸（H₃PO₄；特級）および5 mol/L塩酸（HCl）は関東化学から購入した。無菌精製水は、光製薬から購入した。

4.2.3 患者へのFPVの投与

患者は、初日にFPV1回1,800mgを1日2回経口投与（朝夕食後）し、2～10日目（必要に応じて最大14日目まで）にはFPV1回800mgを1日2回経口投与（朝夕食後）された。なお、FPVの薬剤提供は、厚生労働科学研究費等において行われる観察研究の枠組みの中で行われ、別途、当該研究への参加等の手続きを行っており、治療開始に先立ち、医師から患者又はその家族等に有効性及び危険性（胎児への曝露の危険性を含む）を十分に文書で説明を行い、患者又はその家族から文書での同意を得てから投与を開始している。

4.2.4 血中FPV濃度の定量法

血中（血清）FPV濃度の詳細な定量方法は第3章に記載の通りである（本章では「血中」FPV濃度と「血清」FPV濃度は同様の意味で扱う）。FPVのHPLC分析に先立つSPE法には、遠心式スピナーカートリッジ（MonoSpinC18，ジーエルサイエンス）を使用した。溶液（または患者血清）は、Himac CT15E遠心分離機（工機ホールディングス）を用いて5,000 rpm（2,400×g）で遠心分離することによりSPEカートリッジに通液させた。その後、血清中のFPVを精製し、HPLC分析のために採取した。HPLC分析は、Chromaster（日立ハイテクサイエンス）を使用した。SPE後のFPVのHPLCによる分離には、ODSモノリスカラムを用いた逆相分配モードで、30℃で実施した。FPVを含む分析物（注入量：20 μL）を移動相溶媒（0.1%リン酸：CH₃CN，95：5，v/v）で2 mL/minの流速で溶出させ、溶出液中のFPVは325 nmでUV検出された。患者血清は、SPEによる前処理前にDISMIC 13HPシリンジフィルター（0.45 μm；ADVANTEC）

で濾過した。

生化学検査等のために朝に採血した血清の残余血清を上記の血中 FPV 濃度測定に使用した。ただし、使用する血清は、いずれも FPV の経口投与前（トラフ値）のものを使用した。患者血清は凍結保存し、1 ヶ月以内に測定した（別途、その保存方法と期間において FPV の安定性を確認している）。FPV が定常状態に達した後の経口投与前期間中に血中 FPV 濃度の測定を複数回行った場合は、血中 FPV 濃度は複数回の測定値の平均値として算出した。

4.2.5 血中 FPV 濃度に影響を与える因子の探索

各被験者の年齢、性別、COVID-19 の重症度、合併症の有無、検査データを調査し、血中 FPV 濃度に影響する因子を探索した。本研究では、各被験者の COVID-19 の重症度を厚生労働省の COVID-19 診療の手引き（第 4.1 版、<https://www.mhlw.go.jp/content/000712473.pdf>）に従って、軽度、中等度、高度に分類した。併存疾患の有無は、糖尿病、高血圧、心血管系疾患、慢性肺疾患、免疫不全疾患のうち 1 つ以上の有無に基づいて分類した。FPV 投与前の臨床検査値には、白血球（WBC）、アラニントランスアミナーゼ（ALT）、CRP、血清フェリチン、D ダイマー、血清尿酸、推定糸球体濾過量（eGFR）などを調査した。

4.2.6 FPV 投与前後の血清尿酸値の評価

Wang らによる報告¹¹⁾に基づいて、被験者を血中 FPV 濃度が 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の群と血中 FPV 濃度が 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満の群に大別した。FPV 投与前と投与後の尿酸値を測定し、両者の差（尿酸値の変化）を評価した。FPV 投与前の尿酸値は、入院時に測定した結果を用いた。さらに、FPV 投与後に尿酸値の測定を複数回行った場合は、複数回の測定値の平均値を算出した。

4.2.7 統計解析

連続尺度は、正規分布の場合は平均値±標準偏差、正規分布でない場合は中央値および四分位範囲を算出した。Wang らによる報告¹¹⁾に基づき、被験者を血中 FPV 濃度が 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の群と血中 FPV 濃度が 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満の群に分類し、パラメータを比較検討した。名義尺度（性別等）は、頻度集計および Fisher's exact test で群間比較した。連続尺度かつ正規性を仮定できる変数には、要約統計量として平均±標準偏差を算出し、Unpaired t-test で群間比較した。連続尺度かつ正規性が仮定でない変数、または順序変数には、要約統計量として中央値と四分位範囲を算出し、Mann-whitney U test で群間比較した。

血中 FPV 濃度に影響を与える因子に関して、先行研究を含めて予備的な知見が不足しているため、対数変換を行った血中 FPV 濃度（トラフ値）を従属変数とする線形回帰分析を行った。症例数が 30 例未満と限られており、多変量解析を行う変数を限定す

るため、まず関連性が推察される因子を単変量回帰分析した。次に有意な説明変数のみを選択し、強制投入法（多変量モデル 1）およびステップワイズ法（多変量モデル 2）の 2 つのモデルで多変量解析を探索的に行った。また、FPV 投与後の尿酸値上昇に影響する因子も同様に多変量解析を実施した。

尿酸値は正規分布に近似したデータであるため、パラメトリックな手法を採用した。FPV 投与前後（群内要因）と血中濃度高低（群間要因）を同時に評価するデータであるため、尿酸値を従属変数とし、投与前後と血中濃度高低及びその交互作用項を固定効果とする反復測定分散分析（repeated measures ANOVA）を利用して解析を行った。また、本研究の血中 FPV 濃度のカットオフ値の妥当性を検証するために、尿酸値が 2 mg/dL 以上に上昇する血中 FPV 濃度（トラフ値）について ROC（Receiver operator characteristic）解析も併せて実施した。

両側 p 値 < 0.05 を統計的に有意とし、統計解析はすべて SPSS for Windows(ver. 24.0) を用いて実施した。

4.3 結果

4.3.1 COVID-19 患者の背景と FPV 投与後の血中 FPV 濃度

Table 4-1 に 27 名の患者の属性と主要な血液検査結果（血中 FPV 濃度を含む）の分布を示す。また、Table 4-2 は、全患者の COVID-19 重症度、血中 FPV 値（FPV 投与後のトラフ値）、血清フェリチン値（FPV 投与前）の詳細なデータを示した。Table 4-3 は、患者を血中 FPV 低値群（20 µg/mL 未満：n=6）と高値群（20 µg/mL 以上：n=21）に分けて示した。

Table 4-1 Background for COVID-19 patients treated with FPV (n=27).

Variables	number or median	(% or IQR)
Gender – no./total no. (%)		
Male	17/27	(63.0)
Female	10/27	(37.0)
Median age (IQR) – yr	63	(49, 85)
Severity of COVID-19 – no./total no. (%)		
Mild	6/27	(22.2)
Moderate	19/27	(70.4)
Severe	2/27	(7.4)
Comorbidity – no./total no. (%)	13/27	(48.1)
Blood levels – median (IQR)		
FPV (µg/mL)	42.1	(22.3, 85.5)
WBC (/µL)	5400	(4300, 6100)
ALT (U/L)	21	(13, 34)
LDH (U/L)	217	(181, 265)
CRP (mg/dL)	1.2	(0.7, 7.7)
Ferritin (ng/mL)	242.1	(177.5, 835.3)
D-dimer (µg/mL)	0.5	(0.2, 1.3)
Uric acid (mg/dL)	5.0	(4.5, 5.7)
eGFR (mL/min/1.73m ²) – median (IQR)	67.2	(59.0, 84.0)

Data are presented as number (%) or median (interquartile range; IQR).

Blood FPV levels were calculated as the mean trough level after reaching a steady-state of FPV.

Table 4-2 List of blood levels of FPV, ferritin, and uric acid in COVID-19 patients treated with FPV.

Patient No.	Severity of COVID-19	FPV * ¹ (µg/mL)	Ferritin * ² (ng/mL)	Uric acid (mg/dL)		
				before FPV administration	after FPV administration	difference
1	moderate	1.9	915.6	8.3	8.7	0.4
2	moderate	2.2	1117.0	4.6	5.9	1.3
3	severe	2.7	1905.0	4.0	2.5	-1.5
4	moderate	7.1	1102.0	4.7	7.1	2.4
5	moderate	10.2	1178.0	5.2	6.8	1.6
6	moderate	17.7	1088.0	7.9	8.3	0.4
7	moderate	22.3	202.7	5.0	11.8	6.8
8	moderate	22.8	197.0	ND	9.2	ND
9	moderate	25.4	425.0	4.1	7.0	2.9
10	moderate	25.8	137.8	5.3	8.4	3.1
11	moderate	30.9	172.1	4.5	8.6	4.1
12	mild	33.1	ND	4.4	9.7	5.3
13	moderate	36.2	359.6	3.0	4.4	1.4
14	mild	42.1	217.6	4.8	8.7	3.9
15	moderate	50.7	477.4	5.2	8.6	3.4
16	mild	55.5	ND	5.0	9.1	4.1
17	moderate	56.1	484.9	4.5	8.4	3.9
18	moderate	61.0	594.4	5.0	9.0	4.0
19	mild	77.6	ND	4.5	9.9	5.4
20	moderate	79.2	189.9	4.4	7.9	3.5
21	moderate	85.5	221.4	5.5	9.3	3.8
22	moderate	91.1	197.9	9.1	12.2	3.1
23	moderate	93.5	173.4	3.0	10.8	7.8
24	severe	112.2	262.7	6.4	10.0	3.6
25	mild	125.2	85.2	6.9	11.2	4.3
26	mild	148.0	92.2	ND	9.9	ND
27	moderate	180.9	104.4	5.9	11.4	5.5

ND: No data

*1: blood FPV level was calculated as the mean trough level after reaching a steady-state of FPV.

*2: All data were measured before FPV administration.

Table 4-3

Background and blood test values for COVID-19 patients before FPV administration, and blood FPV levels after FPV administration, compared between low and high blood FVP level groups.

	COVID-19 patents treated with FVP (n=27)						p value	
	Low blood FVP level group (less than 20 µg/mL)			High blood FVP level group (20 µg/mL or more)				
	n	media n	[%] or [IQR]	n	media n	[%] or [IQR]		
Number of patients	6			2				
Gender	6			2			0.057	a
Male	6		[100]	1		[52.4]		
Female	0		[0]	1		[47.6]		
Age	6	69.0	[65.8, 72.0]	2	61.0	[36.0, 86.5]	0.414	b
Severity of COVID-19	6			2			0.101	b
Mild	0		[0]	6		[28.6]		
Moderate	5		[83.3]	1		[66.7]		
Severe	1		[16.7]	4		[4.8]		
Comorbidity	3		[50.0]	1		[47.6]	>0.999	a
0				0				
Blood levels								
FPV(µg/mL)	6	4.9	[2.1, 12.1]	2	56.1	[32.0, 92.3]	–	b
WBC (/µL)	6	6650	[6100, 6700]	1	4700	[4050, 5950]	0.003	b
ALT (U/L)	6	46	[24, 65]	2	16	[12, 30]	0.014	b
LDH (U/L)	6	359	[257, 430]	1	195	[180, 240]	0.002	b
CRP (mg/dL)	6	10.9	[8.3, 16.7]	2	0.7	[0.3, 3.8]	0.000	b
Ferritin (ng/mL)	6	1109.5	[1044.9, 1359.8]	1	200.3	[163.5, 376.0]	0.000	b
D-dimer (µg/mL)	6	0.45	[0.3, 0.8]	8	0.35	[0.1, 1.4]	0.946	b
Uric acid (mg/dL)	6	4.95	[4.5, 8.0]	1	5	[4.4, 5.5]	0.545	b
eGFR (mL/min/1.73m ²)	6	65	[50.5, 80.0]	9	67.2	[60.4, 88.0]	0.382	b

Data are presented as number [%] or median [interquartile range; IQR].

FPV blood level was calculated as the mean trough level after reaching a steady-state of FPV.

a: Categorical variables evaluated by Fisher's exact test, b: Continuous variables evaluated by Mann-Whitney U test.

4.3.2 血中 FPV 濃度とフェリチン濃度の相関性

Fig. 4-1 は、Table 4-2 に示した各患者の血中 FPV 濃度とフェリチン濃度をプロットしたものである。フェリチン濃度が約 600 ng/mL 未満の血中 FPV 濃度の範囲は 20～180 $\mu\text{g/mL}$ にある傾向が分かり、一方で 900 ng/mL を超えると血中 FPV 濃度はすべて 20 $\mu\text{g/mL}$ 未満にあった。Table 4-4 は、対数変換した血中 FPV 値を従属変数とした線形回帰分析の結果である。単変量解析では、血中 FPV 濃度に有意な関連性を有するパラメータは、ALT、CRP、フェリチンであった。これらの有意変数を強制投入したところすべての有意性が消失した (Table 4-4 多変量モデル 1)。これは、共線性の指標である VIF 値が 3 を超えており、ある程度高い共線性を認めた。そこで、有意変数をステップワイズ法で投入し、統計学的に有意性が保たれる変数の組み合わせを探索したところ、フェリチンのみが血中 FPV 濃度に独立して影響を与える因子であることが分かった (Table 4-4 多変量モデル 2)。

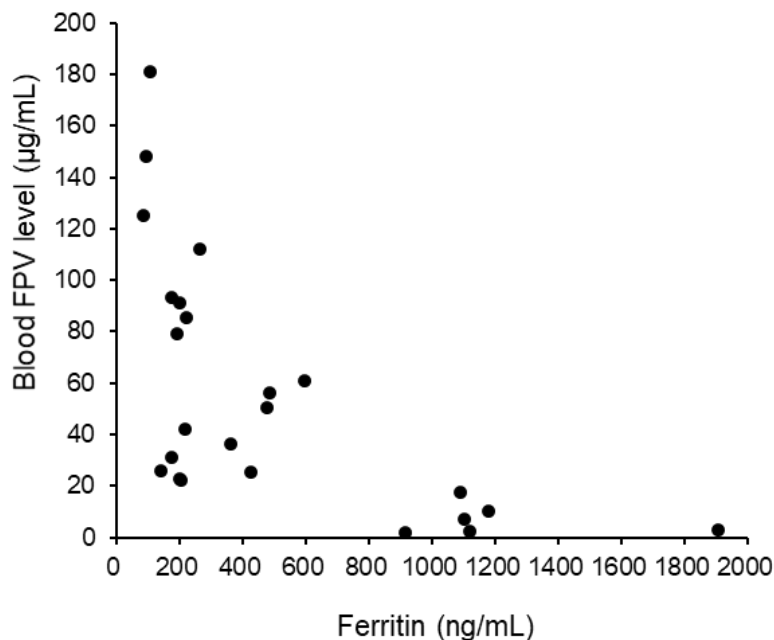


Fig. 4-1 Plots of blood FPV levels of all patients (n = 27) against their serum ferritin levels.

Table 4-4 Linear regression analysis with "ln blood FPV level (trough value)" as the dependent variable

	Univariate						Multivariate model 1 : Forcibly input a significant variable with a univariate						Multivariate model 2 : Input significant variables in univariates by stepwise method					
	n	PRC	SE	SPRC	t value	p value	PRC	SE	SPRC	t value	p value	VIF	PRC	SE	SPRC	t value	P value	VIF
Age (per 1 year)	27	-0.012	0.010	-0.231	-1.186	0.247	–						–					
Gender (Female vs. Male)	27	0.932	0.471	0.368	1.978	0.059	–						–					
Severity of COVID-19	27						–						–					
Mild	6	ref																
Moderate	19	-0.899	0.572	-0.336	-1.572	0.129												
Severe	2	-1.382	0.998	-0.296	-1.386	0.179												
Comorbidity	27	0.155	0.489	0.063	0.317	0.754	–						–					
WBC (per 1000/ μ L)	27	-0.214	0.197	-0.212	-1.084	0.289	–						–					
ALT (per 1U/L)	27	-0.039	0.011	-0.567	-3.444	0.002	-0.013	0.010	-0.190	-1.285	0.214	1.610	n.e.					
CRP (per 1 mg/dl)	27	-0.190	0.029	-0.792	-6.486	0.000	-0.108	0.050	-0.441	-2.176	0.042	3.037	n.e.					
Ferritin (per 100 ng/mL)	24	-0.222	0.035	-0.805	-6.361	0.000	-0.091	0.063	-0.328	-1.444	0.164	3.800	-0.222	0.035	-0.805	-6.361	0.000	1.000
D-dimer (per 1 μ g/mL)	24	0.079	0.149	0.113	0.533	0.599	–						–					
Uric acid (per 1 mg/dL)	25	0.000	0.177	0.000	-0.002	0.998	–						–					
eGFR (per 1 ml/min/1.73m ²)	27	0.010	0.014	0.136	0.687	0.498	–						–					

PRC; Partial Regression Coefficient, SE; Standard error, SPRC; Standardized Partial Regression Coefficient, VIF; Variance Inflation Factor, ref: reference standard, n.e.; not entered.

dependent variable : "FPV blood level (trough value)" that has undergone logarithmic conversion

Multivariate model 1: R²=0.729, Adjusted R²=0.688

Multivariate model 2: R²=0.648, Adjusted R²=0.632

4.3.3 血中 FPV 濃度と尿酸値の相関性

Table 4-2 には、各患者の FPV 投与前後の尿酸値と FPV 投与後の尿酸値の変化も示している。Fig. 4-2 に、血中 FPV 濃度と FPV 投与後の尿酸値変化のプロットを示す。尿酸値の変化が 2 mg/dL を超えるプロットを見ると血中 FPV 濃度が 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上が 19 例中 18 例だった。一方で、尿酸値の変化が 2 mg/dL 未満と大きくないプロットは血中 FPV 濃度が 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満が 6 例中 5 例であった。Table 4-5 に、FPV 投与後に測定した血中尿酸値の変化を従属変数とした線形回帰分析の結果を示す。単変量解析ではいずれも有意な変数であったが、多変量モデル 1（強制投入）および多変量モデル 2（ステップワイズ法）では、eGFR と対数変換した血中 FPV 濃度が尿酸値の変動因子であることが判明した。

Fig. 4-3 には、「FPV 投与後に測定した血中尿酸値の変化量が 2.0 mg/dL 以上」に対する血中 FPV 値の ROC 曲線を示す。Youden Index 法を用いて血中 FPV 濃度のカットオフ値を算出したところ、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった（感度; 0.947, 特異度; 0.833）。

Table 4-6 は、FPV 投与前後の尿酸値の差と血中 FPV 値を同時に評価した結果である。血中 FPV 濃度の高値群（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上）では、FPV 投与後に有意な尿酸値の上昇を認めた。この上昇の大きさは、血中 FPV 濃度の低値群（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満）に比べ有意に大きかった。ただし、例外として、ベースラインの血中 FPV 濃度が 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超えているにもかかわらず、尿酸値が大きく上昇しなかった患者が一例いた（Table 4-2, No.13）。この患者は入院時からフェブキソスタット（40mg/day）を服用していた。

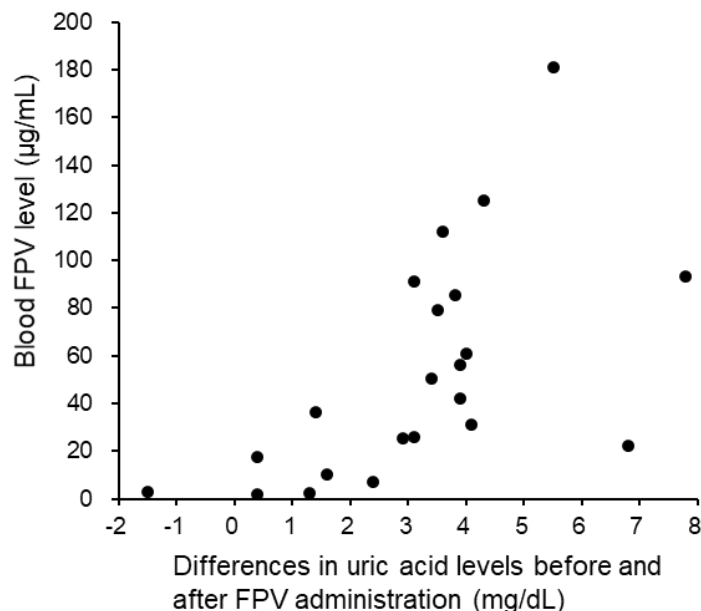


Fig. 4-2 Plots of blood FPV levels against changes in blood uric acid levels measured after FPV administration.

Table 4-5 Linear regression analysis with " changes in blood uric acid levels measured after FPV administration " as the dependent variable.

	Univariate						Multivariate model 1 : Forcibly input a significant variable with a univariate						Multivariate model 2 : Input significant variables in univariates by stepwise method					
	n	PRC	SE	SRC	t value	p value	PRC	SE	SRC	t value	p value	VIF	PRC	SE	SRC	t value	p value	VIF
Gender (Female vs. Male)	25	1.767	0.791	0.422	2.234	0.035	-0.168	0.422	-0.040	-0.397	0.695	1.344	n.e.					
eGFR (per 1 ml/min/1.73m2)	25	0.083	0.020	0.650	4.102	0.000	0.077	0.012	0.605	6.686	0.000	1.081	0.076	0.011	0.595	6.952	0.000	1.007
ln FVP blood level (trough value)	25	1.138	0.243	0.699	4.683	0.000	1.085	0.159	0.666	6.830	0.000	1.255	1.056	0.139	0.648	7.574	0.000	1.007

PRC; Partial Regression Coefficient, SE; Standard error, SRC; Standardized Partial Regression Coefficient, VIF; Variance Inflation Factor, ref: reference standard, n.e.; not entered.

FVP blood level was calculated as the mean trough level after reaching a steady-state of FPV.

Multivariate model 1: $R^2=0.841$, Adjusted $R^2=0.818$

Multivariate model 2: $R^2=0.840$, Adjusted $R^2=0.825$

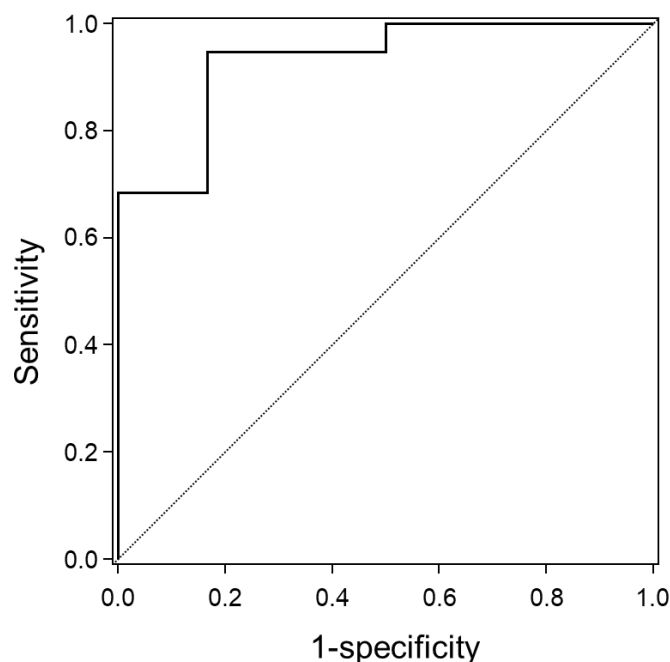


Fig. 4-3 ROC curve of blood FPV levels for “2.0 mg/dL or more changes in blood uric acid levels measured after FPV administration”. The cut-off point was evaluated using ROC curve for calculating the Youden Index. The area under the curve (AUC) was 0.930 (95% confidence interval, 0.817 to 1.000; *P* for difference=0.002). The cut-off point for blood FPV levels was 20 µg/mL or more (sensitivity, 0.947; specificity, 0.833).

Table 4-6 Comparison of uric acid levels of COVID-19 patients between Low blood FPV level group and High blood FPV level group.

	n	Uric acid level (mg/dL) [mean ± SD]			p value
		Before FPV administratio n	After FPV administratio n	Change (after administration)	
Low blood FPV level group (less than 20 µg/mL)	6	5.8 ± 1.8	6.6 ± 2.2	0.8 ± 1.3	0.222
High blood FPV level group (20µg/mL or more)	19	5.1 ± 1.4	9.3 ± 1.8	4.2 ± 1.5	<0.001
p value (High vs. Low)		0.321	0.006	<0.001	

For the time-series transition analysis of the uric acid levels by FPV blood levels, repeated-measures one-way analysis of variance was performed with the uric acid level as the dependent variable and the “before and after FPV administration,” “blood level [high or low],” and their interaction terms as the fixed effects.

4.4 考察

本章では2つの注目すべき知見が得られた。第一に、血中フェリチン値が COVID-19 患者の血中 FPV 濃度に逆相関する重要な独立因子であることが明らかとなった点である。本研究では、血中 FPV 濃度低値群 (20 µg/mL 未満) の患者全員が、高フェリチン血症であった。これらの患者は高齢で、中等症か重症の COVID-19 であった。これは Taneri らが報告した重症 COVID-19 患者のフェリチン値と類似していた¹¹⁵⁾。第3章において FPV が緩衝液 (pH 7.4) 中で選択的に Fe³⁺イオンと複合化することを示した結果を考慮すると、高フェリチン血症の COVID-19 患者の血液中では貯蔵鉄結合フェリチンと FPV 間で相互作用やそれに伴う代謝の変化の可能性が推察される。一方、FPV 投与後に血中 FPV 濃度が 20 µg/mL 以上に上昇した患者は、血中フェリチン濃度が正常値か軽度高値であった。興味深いことに、中等症から重症の COVID-19 でフェリチン値が上昇している患者 (平均 1367 ng/mL) には FPV が無効であることが報告されている¹¹⁰⁾。さらに、COVID-19 患者において FPV 投与後に血中 FPV 濃度が顕著に低下している報告がある^{99, 116)}。このような高フェリチン血症の患者では、血中 FPV 濃度をモニタリングして FPV の投与量を調整 (増量) するか、FPV から他の抗ウイルス剤 (例えばレムデシビルなど) に切り替えることが必要かもしれない^{117, 118)}。今後、FPV の有効性を評価する際には、有効域の血中濃度の探索とともにフェリチン値による影響も考慮する必要があると考える。

次に、血中 FPV 濃度高値群のほとんどの患者に、典型的な FPV の副作用である高尿酸血症を認めた (フェブキソスタット 40mg/日服用群 1 名を除く)。FPV による血中尿酸値の上昇は、FPV とその代謝物 M1 が腎尿細管分泌を調節する有機アニオントランスporter OAT1 および OAT3 を阻害し、URAT1 を介して尿酸の再吸収を促進し、それにより尿酸排泄が減少するためであるが¹¹⁹⁾、血中 FPV 濃度との関連性についてはこれまで知られていなかった。本研究では、FPV 投与後の血中 FPV 高値群の患者において尿酸値の上昇を顕著に認め、平均 4.2 mg/mL の尿酸値上昇を認めた。本結果は、古関らに引用され、ベースラインの尿酸値と定常状態の血清 FPV 濃度 (カットオフ値; 46.14 µg/mL) が高尿酸血症と関連していると報告している¹²⁰⁾。患者背景などが異なるためカットオフ値に違いは認めるが、同様の結果を確認していると考えられる。逆説的にいえば、FPV を投与された COVID-19 患者が高尿酸血症の症状を示さない場合、そのような患者の血中 FPV 濃度は 20 µg/mL 未満である可能性が考えられる。今後 FPV の有効性および安全性を後ろ向きに評価する際に、本結果の利用が期待される。

COVID-19 に対する FPV の EC₅₀ (50%有効濃度) は、61.88 µM (9.72 µg/mL) であることから¹²¹⁾、FPV 経口投与による COVID-19 治療中は、少なくとも 20 µg/mL 以上の血中 FPV 濃度の維持が必要であると仮定した。FPV は COVID-19 以外にもエボラ出血熱や重症熱性血小板減少症候群ウイルスなどにも効果が期待されているが、その効果を検証する際には血中 FPV 濃度のモニタリングが重要であると考えられる。

本研究には2つの限界がある。まず、本研究は単施設による後ろ向きの検討であり、

血中 FPV 濃度が低い COVID-19 患者 (n=6) は、血中 FPV 濃度が高い患者 (n=21) に比べてはるかに少なかったことが挙げられる。COVID-19 に対する FPV の有効性と安全性について、臨床的に意味のある結果を得るためには、より多くの研究対象者を含む研究による検証が必要である。第二に、当院における COVID-19 治療の併用薬の組み合わせは、今回の研究期間中 (2020 年 4 月～2020 年 12 月) に大きな変更があった。この期間は厚生労働省の新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 診療の手引き等も大きく改訂されており、当時の最善の医療を模索した結果といえる。例えば、この期間には、後に COVID-19 治療に対して有効性のエビデンスが得られなかったシクレソニドやナファモスタット、ヒドロキシクロロキンを使用した患者もおり、一方で、後に有効性が確認されたレムデシビルやデキサメタゾンを使用した例もあった。このような大きな背景バイアスを考慮して、本研究では FPV の有効性と (高尿酸血症以外の) 安全性に関しては主要評価項目とせず、藤田医科大学や国立国際医療研究センターが行った観察研究などの結果に委ねることが妥当と判断した。ただし、薬物間相互作用については、本研究では、XO を介した相互作用のあるテオフィリンを併用している患者はいなかったことは付記する。

本研究では、第 3 章で開発した実用的な血中 FPV 濃度の定量法が十分に適用できた。本法は、市中病院である当院のスタッフでも容易に実施することが可能で、業務的にも測定コスト的にも負担は少ないと考えられる。FPV による治療評価の際に、本法による血中 FPV 濃度の定量が広く活用され、新たな知見が創出されることを期待する。

4.5 小括

本章は、FPV を服用した COVID-19 患者の血中 FPV 濃度を測定し、血中 FPV 濃度の増減に影響を及ぼす因子を探索し、以下のことを示した。

- 1) 血中フェリチン値は COVID-19 患者の血中 FPV 濃度に逆相関する重要な独立因子である。
- 2) COVID-19 患者で高フェリチン血症を示す患者では血中 FPV 濃度は、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満の低値となる。
- 3) 血中 FPV 濃度が 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の患者は、FPV 内服開始後に尿酸値が有意に上昇する。一方で、血中 FPV 濃度が 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満の患者は尿酸値の有意な上昇は認めない。
- 4) 第 3 章で構築した血中濃度測定法を用いて、多くの患者の血中 FPV 濃度の測定に活用できる。

以上の結果の中で、特に血中 FPV 濃度とフェリチンおよび尿酸値との関連性について示した初の報告であり、FPV による治療評価の際に参考になり得る知見と考える。

総括

治療薬物モニタリング (TDM) や急性中毒時の分析業務およびエビデンスを構築する上で、定量分析技術の基盤は不可欠である。その分析技術は LBA 法と LC 法に大別される。LBA 法は簡易な自動分析装置として一般病院でも繁用されるが、LC 法より真度と精度が劣る他、試薬費も安くはない、抗体等の試薬がない項目は測定できないといった欠点がある。一方、HPLC による定量分析は、半自動化された連続分析が可能で、質量分析計を検出器とした HPLC-MS 法が普及しているが、導入コストと専門的な機器操作や維持管理が必要となることから、運用できる病院は限定される。

臨床現場における定量分析技術には、迅速性・簡便性・経済性が求められる。しかし、多くの病院では、薬物血中濃度分析の外部委託を推進し、院内での分析業務は縮小傾向にある^{4,28,29)}。外注は簡便である反面、迅速性に劣り、委託費用も安くはない。そもそも薬物血中濃度は、刻一刻と変化する臨床所見や検査結果と併せてリアルタイムで考察することに意味があり、迅速性を放棄することで血中濃度測定そのものの価値低下は免れない。

そこで著者は、紫外可視吸光検出器を備えた HPLC-UV 法の可能性を検討することとした。HPLC-UV 法は 1980 年代～90 年代に臨床現場で広く使用されたが^{22,23)}、その後は LBA 法を搭載した自動分析装置の普及と臨床検査の外注化によって保有する医療機関は減少の一途を辿った。しかしながら、HPLC-UV 法は今日でも分析初心者が扱いやすく安定性に優れた分析法であることには変わりはなく、LBA 法や LC-MS/MS 法、GC-MS 法の欠点を補完し、汎用性や簡便性、迅速性、検査項目の拡張性のあるプラットフォームであれば、医療現場において再活用できる可能性を秘めている。

このような背景の元、本博士論文研究は、一般病院でも導入可能なコスト等を加味して、簡便な前処理と HPLC-UV 法を組み合わせた迅速な薬物血中濃度定量分析法をプラットフォームとして構築した。

第 1 章では、病院内での迅速な血中濃度測定法のプラットフォームを構築するための開発に着手した。本研究の基本コンセプトは以下の通りである。① 一般病院の臨床検査技師や薬剤師が日常業務として扱える手法であること、② 高額で特殊な装置や試薬を必要としないこと、③ 多品目の薬物に対して適用可能であり、前処理も含めてほぼ同一の手順で行う手法であること、④ 多検体処理を可能とする迅速性があり、将来的に半自動化が見込めること。

上述の要件を満たす定量分析法として、遠心用スピナートリッジを用いた SPE 法による前処理と ODS モノリスカラムを備えた逆相 HPLC-UV を組み合わせる手法を考案し、最適化を行った。その結果、本邦は 15 品目の薬物の血中濃度定量に適用でき、各薬物の定量下限値は 0.1～1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲であった。各薬物の治療有効濃度領域内での定量バリデーションも良好であった。

第 2 章では、第 1 章で構築した薬物定量分析システムについて、さらに病院内で患

者血清を使用する実臨床での実用性と性能評価を行った。被検薬物には、カルバマゼピン、フェニトイン、バンコマイシン、ラモトリギン、ポリコナゾールを用いた。薬物血中濃度の定量は上述の手順と同様に行ったが、患者血清の遠心用スピナーカートリッジの通液性を考慮して、遠心時間や血清添加前にメンブランフィルターを用いるなど改良も施している。また、本法以外の血中濃度定量法として、通常業務として院内の自動分析装置 (cobas®) による測定と外注 (HPLC-MS/MS) による測定も同時に行い、本法で得た薬物定量値と cobas および HPLC-MS/MS での検査結果を比較評価した。その結果、臨床検体であっても本手法に改良を加えることで応用が可能となった。また、臨床検査技師や薬剤師が 1 回 10 分程度と短時間で前処理を行うことができ、その繰り返し精度は良好であった。さらに、本法と既存手法 (cobas, HPLC/MS/MS) について、定量値の相関性は良好であった。

以上、第 1 章と第 2 章の検討により、本法は特別な分析技術を必要とせずに実施可能であり、院内での TDM 業務における多品目の薬物血中濃度測定への利用が期待される。さらに本プラットフォームは、今回検討した以外の薬剤へも拡張できる可能性があり、更なる検討の価値があると考えた。

第 3 章では 2020 年 2 月から世界的流行となった COVID-19 の治療候補薬として使用されたファビピラビル (FPV) に本プラットフォームを適応すべく検討を行った。FPV は、酸性 pH 条件下で ODS 基に保持・吸着するため、FPV 添加血清に 5 M 塩酸を加えてから MonoSpin C18 カートリッジに通液するというアレンジを加えた。吸着した FPV を (洗浄を省略して) 10% CH₃CN 水溶液で直接溶出した時に、SPE 回収率が最大となった。この SPE 処理と逆相 HPLC 分析を組合せて、定量バリデーションを行った結果、日内・日間の真度、精度のいずれも良好であった。また、多座配位子構造を有する FPV と選択的に錯形成する金属イオン種についても調べたところ、FPV は Fe³⁺ および Cu²⁺ と選択的に錯形成したため、これらの金属イオンの関与する内在性因子と血中 FPV 濃度の関連が示唆された。

薬物血中濃度が治療効果と副作用発現に密接に関連するとき、薬物血中濃度の把握は投与設計の指標となる^{16, 17)}。そのため全ての薬剤について TDM が必要という訳ではないが、TDM が必須もしくは有用な薬剤は多数存在する。薬物血中濃度の測定は、患者の服薬アドヒアランスの判断も可能とし、多剤併用患者で薬物間相互作用の影響を検討する上などでも役立つ。また、TDM の有用性について薬物動態学的な検討が十分でない項目については、薬物血中濃度をモニタリングすることが、新しい知見につながるかもしれない。

第 4 章では、第 3 章で構築した FPV の血中濃度測定法を用いて、FPV の血中濃度に影響を与える因子の探索を行った。自施設内において 2020 年 4 月～12 月までに COVID-19 感染症で入院し、FPV による治療を受けた 27 名の患者に対して後ろ向き研究を企図した。FPV を服用した COVID-19 患者の血中 FPV 濃度を測定し、血中 FPV 濃度の増減に影響を及ぼす因子を探索したところ、以下のことを示した。① 血中フェリ

チン値は COVID-19 患者の血中 FPV 濃度に逆相関する重要な独立因子である。② COVID-19 患者で高フェリチン血症を示す患者では血中 FPV 濃度は、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満の低値となる。③ 血中 FPV 濃度が 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の患者は、FPV 内服開始後に尿酸値が有意に上昇する。一方で、血中 FPV 濃度が 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満の患者は尿酸値の有意な上昇は認めなかった。これは血中 FPV 濃度とフェリチン値および尿酸値との関連性について示した初の報告であり、今後、FPV による治療評価の際に参考になり得るものと考えられる。

以上、第 3 章と第 4 章では、FPV の血中濃度測定法を構築し、さらに臨床研究を行うことで、FPV に関する新たな側面を垣間見ることができた。本研究で開発した HPLC-UV プラットフォームは、臨床現場の TDM において、院内で簡便かつ迅速に活用でき、LBA 法などと組み合わせることで、より多くの項目が院内で測定可能になる。さらに診療報酬外の薬剤でも UV 吸収をもち、治療域が ppm オーダーであれば、FPV のように測定項目を拡張することも検討できる。

さて、本研究に付言すると、本プラットフォームの構築後に、著者所属の北信総合病院と東京薬科大学生体分析化学教室、日立ハイテクサイエンス社によって更なる共同研究を進めた。本研究で用いた HPLC 分析システムは、汎用 HPLC を用いており、日々慣れ親しんでいる分析担当者であれば問題ないかもしれないが、医療現場で HPLC の初心者が扱うには、臨床検査で汎用されている他の自動分析装置と比較して操作性の面で使いにくさがある。また、日常の精度管理をどう運用していくかも課題であった。その結果、日立ハイテクサイエンス社は、本研究の HPLC-UV プラットフォームを基盤とした LM1010 システムを開発し、2020 年 2 月に一般医療機器（特定保守管理医療機器）として PMDA に届出した（製造販売届出番号：22B3X10009000003）。

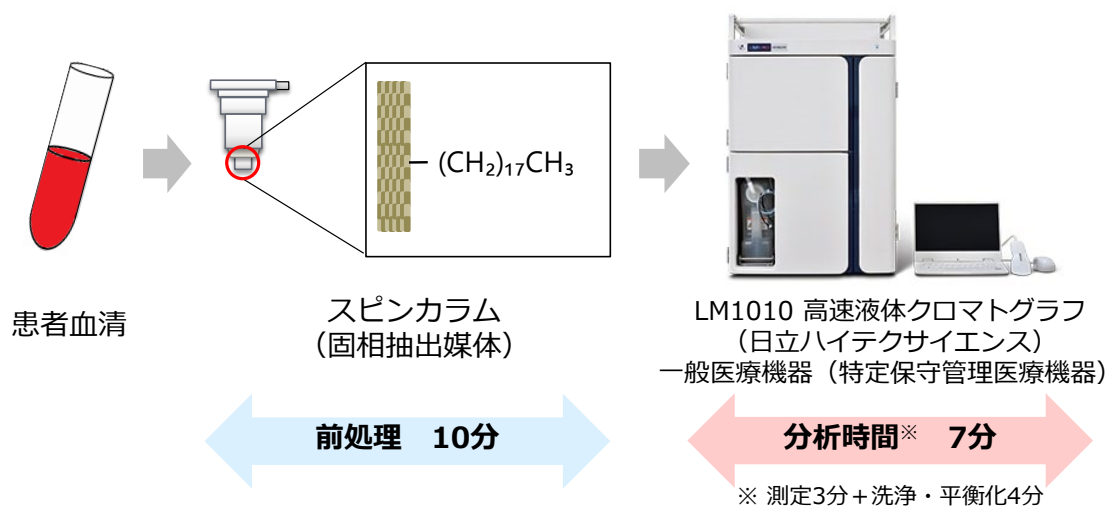


Fig. 5 Outline of the procedure of LM1010.

Table 3 Measurable drugs with LM1010 (as of March 2023).

薬効	薬剤	薬効	薬剤
抗てんかん薬	カルバマゼピン	抗真菌薬	ポリコナゾール
	フェニトイン		ポサコナゾール
	ラモトリギン		フルコナゾール
抗精神病薬	クロザピン	抗菌薬	リネゾリド
	フレカイニド		テジゾリド
	プロパフェノン		バンコマイシン
	ジソピラミド		メロペネム
不整脈用剤	リドカイン	抗ウイルス薬	ファビピラビル
	メキシレチン	抗がん剤	イマチニブ
	プロカインアミド		パゾパニブ
	ソタロール	免疫抑制剤	ミコフェノール酸
	アミオダロン/デスエチルアミオダロン	中枢興奮・鎮痛剤	カフェイン

LM1010 は、分析前のコンディショニングや分析条件の設定、日常的な装置の性能確認などを全て自動で実施でき、分析担当者の知識・経験に左右されることなく安定した測定結果を得ることを可能としている。2023年3月現在、24品目（Table 3）の薬物血中濃度の定量に適応でき、臨床で想定される血中濃度範囲での定量バリデーションは良好である。LM1010 を用いた臨床評価では、ポリコナゾール¹²²⁾やミコフェノール酸¹²³⁾の報告があり、全国で使用され始めている。

また、著者は日本中毒学会分析委員会の委員として、本法を用いたカフェインの血中濃度測定を日本中毒学会の会期中のハンズオンセミナーで行った¹²⁴⁾。その際にアンケート調査を実施したが、本法の前処理および HPLC 分析の難易度は、多くの参加者が簡便に感じていた（Table 4）。また、薬毒物や TDM における分析業務を院内で実施している参加者は約半数で、外部委託や分析をしていない回答もあった。これらは学会の限られた参加者からの調査ではあるが、薬毒物や TDM における分析結果は即日結果が得られることが重要であると考える参加者が大多数であったことも付け加えておく（Table 5）。

Table 4 Results of the Hands-On Instrumental Analysis Seminar Questionnaire¹²²⁾.

1. 参加者の職業（実人数：63人、延べ人数：68人）		3. HPLC 分析の難易度はいかがでしたか？（n=61人）	
医師	9人（13.2%）	非常に簡便	16人（26.2%）
薬剤師	38人（55.9%）	簡便	23人（37.7%）
臨床検査技師	8人（11.8%）	普通	20人（32.8%）
分析担当者	9人（13.2%）	少し難しい	2人（3.3%）
その他	4人（5.9%）	難しい	0人（0%）
2. 前処理の難易度はいかがでしたか？（n=61人）		4. 自施設において本法を導入したいと思いましたか？（n=59人）	
非常に簡便	18人（29.5%）	強く思った	7人（11.9%）
簡便	26人（42.6%）	思った	14人（23.7%）
普通	15人（24.6%）	興味あり	32人（54.2%）
少し難しい	2人（3.3%）	あまり思わなかった	6人（10.2%）
難しい	0人（0%）	思わなかった	0人（0%）

Table 5 Survey on quantitative analysis of drug toxicology¹²².

1. 薬毒物やTDMにおいて分析を実施していますか？ (実人数：55人，延べ人数：66人)		
院内で分析している	34人(51.5%)	
外部委託している	26人(39.4%)	
分析していない	6人(9.1%)	
2. 院内で分析している場合の使用装置は何ですか？ (実人数：28人，延べ人数：48人)		
免疫学的測定法	13人(27.1%)	
LC-MS/MS	13人(27.1%)	
HPLC	10人(20.8%)	
その他	12人(25.0%)	
3. 薬毒物やTDMにおける分析結果が、即日に結果が得られることは重要と思いますか？ (n=50人)		
強く思う	38人(76.0%)	
思う	11人(22.0%)	
あまり思わない	0人(0%)	
思わない	1人(2.0%)	

法医学や科学捜査においては、薬毒物の定性および定量分析は死因究明のためであり、LC-MS/MSやGC-MSは必要欠くべからざるものである。一方で臨床現場においてもまた、TDMにおける薬物血中濃度の定量分析は核となるにも関わらず、現時点でその環境は十分とは言えない。しかしながら、そういった状況下にあっても、迅速に結果を得たいと望む臨床家がいるということは、今後の定量分析法の開発を考える上で示唆に富むものではないだろうか。

個別化医療に貢献するためには薬物血中濃度測定が重要であり、本研究では、日常診療で使用できるレベルの定量分析法をHPLC-UVプラットフォームとして構築することができた。本法は極めて拡張性が高く、本研究で検討した薬物以外にも広く適用できる可能性がある。今後、抗がん薬や抗菌薬、抗ウイルス薬、そして中毒起因物質等に対して、さらに本法適用の可否を検証し、本法の適用拡大を進めていくことは十分に有用である。最後に、本プラットフォームが臨床で広く使用され、医療の質の向上に寄与することを切に期待して結びとする。

謝辞

学生時代から社会人になった後も至らぬ私を終始懇切なる御指導を賜りました東京薬科大学薬学部生体分析化学教室教授 柳田顕郎 博士に深甚なる感謝の意を表します。本学位論文の作成においても的確なご指導ご鞭撻を賜りましたこと、重ねて御礼申し上げます。

本学位論文をご高閲いただきました東京薬科大学薬学部臨床薬剤学教室教授 下枝貞彦 博士，薬物代謝分子毒性学教室教授 山折大 博士および分析化学教室教授 袴田秀樹 博士に心より感謝の意を表します。

本研究は，東京薬科大学薬学部生体分析化学教室との共同研究の成果であり，共同研究の機会を頂き，常に温かくご支援いただきました東京薬科大学名誉教授 澁澤庸一 博士，研究全般にわたるご指導を賜りました東京薬科大学薬学部生体分析化学准教授 東海林敦 博士，分析法についてご指導・ご助言を賜りました同助教 守岩友紀子 博士に感謝申し上げます。また，実験に協力頂いた返町美穂氏，土屋達寛氏，田村和季氏に深く感謝いたします。

本研究に際して，研究の機会を与えてくださいました JA 長野厚生連北信総合病院名誉院長 小田切徹太郎 博士，前薬剤部長 池田健一氏，多大なご支援とご指導をいただきました JA 長野厚生連 代表理事理事長 洞和彦 博士，JA 長野厚生連北信総合病院薬剤部部長 岡澤香津子氏，副薬剤部長 久保田健氏に心から御礼申し上げます。さらに実験にご協力いただいた臨床検査技師長 深海和人氏，ならびに多くのご教示をいただきました薬剤部と臨床検査科の皆様に厚く感謝いたします。そして，新型コロナウイルス感染症によるパンデミック下においても献身的に医療に従事する関係者の皆様に深く感謝いたします。

また，本研究の趣旨をご理解いただき，ご協力いただいた患者，家族の皆様に心より感謝申し上げます。

本研究は，株式会社日立ハイテクサイエンスとの共同研究により遂行することができました。サービス販促部サービス販促二課 松下美由紀氏，橋本誠氏，森川悟氏，ならびに関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

研究生活全般を温かく支援してくれた義父 黒岩源 博士，義母 靖代，これまで常に見守って支えてくれた父 千晴，母 豊子に深く感謝いたします。

最後に研究生活を支えてくれて，叱咤激励し，本学位論文の校正も手伝ってくれた妻 鮎美，そして息子の豪仁に感謝の意を表します。

主論文目録

本学位論文は以下の学位論文を主論文とした。

- 1) 森川 剛, 反町 美穂, 田村 和季, 守岩 友紀子, 東海林 敦, 岡澤 香津子, 柳田 顕郎. 多品目の薬物を対象とする病院内での血中濃度測定のための実用的な HPLC 分析法の開発. *分析化学*, **68**, 473-481 (2019).
- 2) Go Morikawa, Kazuto Fukami, Yukiko Moriiwa, Katsuko Okazawa, Akio Yanagida. Evaluation of the clinical and quantitative performance of a practical HPLC-UV platform for in-hospital routine therapeutic drug monitoring of multiple drugs. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, **9**, 29 (2023). <https://doi.org/10.1186/s40780-023-00298-7>.
- 3) Yukiko Moriiwa, Go Morikawa, Katsuko Okazawa, Akio Yanagida. Optimization of Analytical Procedure for In-hospital Rapid Quantification of Serum Level of Favipiravir in the Pharmacological Treatment of COVID-19. *Analytical sciences*, **37**, 1301-1304 (2021).
- 4) Go Morikawa, Ken Kubota, Daichi Kondo, Yasuhisa Takanashi, Satoshi Minami, Tsunemichi Kinjo, Yukiko Moriiwa, Akio Yanagida, Katsuko Okazawa, Tomoshige Chiaki. Elevated blood favipiravir levels are inversely associated with ferritin levels and induce the elevation of uric acid levels in COVID-19 treatment: A retrospective single-center study. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **28**, 73-77 (2022).

引用文献

- 1) Hamburg MA, Collins FS, The path to personalized medicine. *N Engl J Med*, **363**, 301-4 (2010).
- 2) Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med*, **372**, 793-5 (2015).
- 3) Cremers S, Guha N, Shine B. Therapeutic drug monitoring in the era of precision medicine: opportunities! *Br J Clin Pharmacol*, **82**, 900-2 (2016).
- 4) 辻 大樹, 斎藤 嘉朗, 薙田 泰誠, 三浦 昌朋, 平 大樹, 寺田 智祐. 薬学的視点に基づいたプレシジョン・メディシンの国内基盤構築のための調査研究. *医療薬学*, **46**, 66-76 (2020).
- 5) Darwich AS, Ogungbenro K, Vinks AA, Powell JR, Reny JL, Marsousi N, Daali Y, Fairman D, Cook J, Lesko LJ, McCune JS, Knibbe C, de Wildt SN, Leeder JS, Neely M, Zuppa AF, Vicini P, Aarons L, Johnson TN, Boiani J, Rostami-Hodjegan A. Why has model-informed precision dosing not yet become common clinical reality? lessons from the past and a roadmap for the future. *Clin Pharmacol Ther*, **101**, 646-656 (2017).
- 6) Pérez-Blanco JS, Lanao JM. Model-Informed Precision Dosing (MIPD). *Pharmaceutics*, **14**, 2731 (2022).
- 7) Ates HC, Roberts JA, Lipman J, Cass AEG, Urban GA, Dincer C. On-Site Therapeutic Drug Monitoring. *Trends Biotechnol*, **38**, 1262-1277 (2020).
- 8) 日本薬史学会 編. 薬学史入門. 薬事日報, 東京, 2022.
- 9) アクセル・カーン, イヴァン・ブローアール, オリヴィエ・ラフォン, フレデリック・ダルデル, ベルナール・P・ロック. 日仏薬学会, 日本薬史学会翻訳. 薬学の歴史 - くすり・軟膏・毒物. 薬事日報, 東京, 2017.
- 10) 西川 隆. 東京帝国大学医学部薬学科-人物と事績でたどる「宗家」の責任と挑戦-. 薬事日報, 東京, 2020, pp. 30-33.
- 11) E.M. Widmark. Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der gerichtlich-medizinischen Alkoholbestimmung. *JAMA*, **98**, 1834 (1932).
- 12) Shannon JA, Earle DP, Brodie BB, Taggart JV, Berliner RW; The Resident Staff Of The Research Service. The pharmacological basis for the rational use of Atabrine in the treatment of malaria. *J Pharmacol Exp Ther*, **81**, 307-30 (1944).
- 13) Buchthal F, Svensmark O, Schiller PJ. Clinical and electroencephalographic correlations with serum levels of diphenylhydantoin. *Arch Neurol*, **2**, 624-30 (1960).
- 14) Nelson E. Kinetics of drug absorption, distribution, metabolism, and excretion. *J Pharm Sci*, **50**, 181-92 (1961).
- 15) Finney DJ. The design and logic of a monitor of drug use. *J Chronic Dis*, **18**, 77-98 (1965).
- 16) 伊賀立二, 乾 賢一. 薬剤師・薬学生のための実践 TDM マニュアル. じほう, 東京,

- 2004, pp. 3-9.
- 17) Amitava D, "Chapter 1 - Introduction to Therapeutic Drug Monitoring: Frequently and Less Frequently Monitored Drugs", ed. by Amitava D, "Therapeutic Drug Monitoring", Academic Press, Cambridge, 2012, 1-29.
 - 18) Aronson JK, Hardman M. ABC of monitoring drug therapy: measuring plasma drug concentrations. *BMJ*, **305**: 1078-80 (1992).
 - 19) Martin AJ, Synge RL. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochem J*, **35**, 1358-68 (1941).
 - 20) A. T. James, A. J. P. Martin. Gas-liquid partition chromatography. A technique for the analysis of volatile materials. *Analyst*, **77**, 915-932 (1952).
 - 21) 今任 稔彦, 角田 欣一監訳. クリスマン分析化学 原書 7 版 II. 機器分析. 丸善, 東京, 2017.
 - 22) 村北宏之. 高速液体クロマトグラフィー. *TDM 研究*, **1**, 46-48 (1984).
 - 23) 奥田孝範, 西田正文, 鮫島一郎. 急性中毒性薬毒物の分析. *TDM 研究*, **4**, 44-75 (1987).
 - 24) 日本中毒学会編集. 急性中毒標準診療ガイド. じほう, 東京, 2008.
 - 25) Horning MG, Brown L, Nowlin J, Lertratanangkoon K, Kellaway P, Zion TE. Use of saliva in therapeutic drug monitoring. *Clin Chem*, **23**, 157-64 (1977).
 - 26) Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest*, **39**, 1157-75 (1960).
 - 27) Rubenstein KE, Schneider RS, Ullman EF. "Homogeneous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. *Biochem Biophys Res Commun*, **47**, 846-851 (1972).
 - 28) 日本病院薬剤師会総務部, 令和 3 年度「病院薬剤部門の現状調査」集計結果報告, *日病薬誌*, **58**, 805-35 (2022).
 - 29) Otani N, Hifumi T, Kitamoto T, Kobayashi K, Nakaya N, Tomioka J. Current state of drug analysis in Japanese emergency departments: a nationwide survey. *Acute Med Surg*, **7**, e566 (2020).
 - 30) Dvorchik BH, Vesell ES. Pharmacokinetic interpretation of data gathered during therapeutic drug monitoring. *Clin Chem*, **22**, 868-78 (1976).
 - 31) 厚生労働省. 「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」について. 薬食審査発 0711 第 1 号. 平成 25 年 7 月 11 日.
 - 32) バイオアナリシスフォーラム編集. 医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法バリデーションガイドライン解説 -LC ガイドライン-. じほう, 東京, 2015, p. 17.
 - 33) 厚生労働省. 「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法(リガンド結合法)のバリデーションに関するガイドライン」について. 薬食審査発 0401 第 1 号. 平成 26 年 4 月 1 日.

- 34) FDA, CDER and CMV (in U.S.A): Bioanalytical method validation: Guidance for industry, 24 May 2018.
- 35) European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP): Guideline on bioanalytical method validation, 21 July 2011.
- 36) 小木 修. 免疫分析法の原理. *ぶんせき*, **444**: 697-704 (2011).
- 37) 土下喜正, 堀 哲史, 藤村保夫, 楠本正明. HPLC 導入による抗不整脈薬 TDM の臨床的有用性と経済性の評価. *TDM 研究*, **25**, 152-156 (2008).
- 38) Brandhorst G, Oellerich M, Maine G, Taylor P, Veen G, Wallemacq P. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry or automated immunoassays: what are the future trends in therapeutic drug monitoring? *Clin Chem*, **58**, 821-5 (2012).
- 39) 厚生労働省. 診療報酬の算定方法の一部改正に伴う実施上の留意事項について. 平成 30 年 3 月 5 日保医発 0305 第 1 号.
- 40) Milone MC. Analytical Techniques used in Therapeutic Drug Monitoring, in: A. Dasgupta (Eds.), *Therapeutic Drug Monitoring : Newer Drugs and Biomarkers*. Elsevier; 2012. p. 49-73.
- 41) U.S. Dept. of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Veterinary Medicine (CVM). Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry. 2018. <https://www.fda.gov/media/70858/download>. Accessed 12 Feb 2023.
- 42) Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory--goals for further developments. *Clin Biochem*, **41**, 649-62 (2008).
- 43) Leung KS, Fong BM. LC-MS/MS in the routine clinical laboratory: has its time come? *Anal Bioanal Chem*, **406**, 2289-301 (2014).
- 44) van den Ouweland JM, Kema IP. The role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **883-884**, 18-32 (2012).
- 45) Avataneo V, D'Avolio A, Cusato J, Cantù M, De Nicolò A. LC-MS application for therapeutic drug monitoring in alternative matrices. *J Pharm Biomed Anal*, **166**, 40-51 (2019).
- 46) Verhoven SM, Groszek JJ, Fissell WH, Seegmiller A, Colby J, Patel P, Verstraete A, Shotwell M. Therapeutic drug monitoring of piperacillin and tazobactam by RP-HPLC of residual blood specimens. *Clin Chim Acta*, **482**, 60-64 (2018).
- 47) Milla P, Ferrari F, Muntoni E, Sartori M, Ronco C, Arpicco S. Validation of a simple and economic HPLC-UV method for the simultaneous determination of vancomycin, meropenem, piperacillin and tazobactam in plasma samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **1148**, 122151 (2020).
- 48) Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods*

- Med Res*, **8**, 135-60 (1999).
- 49) Maher HM, Alzoman NZ, Shehata SM, Abahussain AO. Comparative pharmacokinetic profiles of selected irreversible tyrosine kinase inhibitors, neratinib and pelitinib, with apigenin in rat plasma by UPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*, **137**, 258-267 (2017).
 - 50) Qu L, Qian J, Ma P, Yin Z. Utilizing online-dual-SPE-LC with HRMS for the simultaneous quantification of amphotericin B, fluconazole, and fluorocytosine in human plasma and cerebrospinal fluid. *Talanta*, **165**, 449-457 (2017).
 - 51) Pensi D, De Nicolò A, Pinon M, Pisciotta C, Calvo PL, Nonnato A, Romagnoli R, Tandoi F, Di Perri G, D'Avolio A. First UHPLC-MS/MS method coupled with automated online SPE for quantification both of tacrolimus and everolimus in peripheral blood mononuclear cells and its application on samples from co-treated pediatric patients. *J Mass Spectrom*, **52**, 187-195 (2017).
 - 52) Qu L, Fan Y, Wang W, Ma K, Yin Z. Development, validation and clinical application of an online-SPE-LC-HRMS/MS for simultaneous quantification of phenobarbital, phenytoin, carbamazepine, and its active metabolite carbamazepine 10,11-epoxide. *Talanta*, **158**, 77-88 (2016).
 - 53) Maher HM, Alzoman NZ, Shehata SM. Simultaneous determination of selected tyrosine kinase inhibitors with corticosteroids and antiemetics in rat plasma by solid phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to pharmacokinetic interaction studies. *J Pharm Biomed Anal*, **124**, 216-227 (2016).
 - 54) Mano N, Sato M, Nozawa M, Matsumoto Y, Mori M, Yamaguchi H, Goto J, Shimada M. An accurate quantitative LC/ESI-MS/MS method for sirolimus in human whole blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **879**, 987-92 (2011).
 - 55) Koal T, Deters M, Casetta B, Kaefer V. Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **805**, 215-22 (2004).
 - 56) Mercolini L, Mandrioli R, Amore M, Raggi MA. Simultaneous HPLC-F analysis of three recent antiepileptic drugs in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*, **53**, 62-7 (2010).
 - 57) Berthoin K, Ampe E, Tulkens PM, Carryn S. Correlation between free and total vancomycin serum concentrations in patients treated for Gram-positive infections. *Int J Antimicrob Agents*, **34**, 555-60 (2009).
 - 58) Mercolini L, Grillo M, Bartoletti C, Boncompagni G, Raggi MA. Simultaneous analysis of classical neuroleptics, atypical antipsychotics and their metabolites in human plasma. *Anal Bioanal Chem*, **388**, 235-43 (2007).
 - 59) Mercolini L, Bugamelli F, Kenndler E, Boncompagni G, Franchini L, Raggi MA.

- Simultaneous determination of the antipsychotic drugs levomepromazine and clozapine and their main metabolites in human plasma by a HPLC-UV method with solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **846**, 273-80 (2007).
- 60) Notari S, Bocedi A, Ippolito G, Narciso P, Pucillo LP, Tossini G, et al. Simultaneous determination of 16 anti-HIV drugs in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **831**, 258-66 (2016).
- 61) Marzolini C, Telenti A, Buclin T, Biollaz J, Decosterd LA. Simultaneous determination of the HIV protease inhibitors indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **740**, 43-58 (2000).
- 62) Samanidou VF, Ioannou AS, Papadoyannis IN. The use of a monolithic column to improve the simultaneous determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids by HPLC after solid phase extraction--a comparison with a conventional reversed-phase silica-based column. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **809**, 175-82 (2004).
- 63) Zarghi A, Shafaati A, Foroutan SM, Khoddam A. Simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for determination of celecoxib in plasma using UV detection: application in pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **835**, 100-4 (2006).
- 64) Foroutan SM, Zarghi A, Shafaati A, Khoddam A. Application of monolithic column in quantification of gliclazide in human plasma by liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, **42**, 513-6 (2006).
- 65) Prah J, Lundqvist M, Bahl JM, Johansen IS, Andersen ÅB, Frimodt-Møller N, Cohen AS. Simultaneous quantification of isoniazid, rifampicin, ethambutol and pyrazinamide by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *APMIS*, **124**, 1004-1015 (2016).
- 66) Perea S, Pennick GJ, Modak A, Fothergill AW, Sutton DA, Sheehan DJ, Rinaldi MG. Comparison of high-performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of voriconazole levels in plasma. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**, 1209-13 (2000).
- 67) Theurillat R, Zimmerli S, Thormann W. Determination of voriconazole in human serum and plasma by micellar electrokinetic chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, **53**, 1313-8 (2010).
- 68) Péhourcq F, Jarry C, Bannwarth B. Direct injection HPLC micro method for the determination of voriconazole in plasma using an internal surface reversed-phase column. *Biomed Chromatogr*, **18**, 719-22 (2004).
- 69) Wenk M, Droll A, Krähenbühl S. Fast and reliable determination of the antifungal drug

- voriconazole in plasma using monolithic silica rod liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **832**, 313-6 (2006).
- 70) Nakagawa S, Suzuki R, Yamazaki R, Kusuhara Y, Mitsumoto S, Kobayashi H, Shimoeda S, Ohta S, Yamato S. Determination of the antifungal agent voriconazole in human plasma using a simple column-switching high-performance liquid chromatography and its application to a pharmacokinetic study. *Chem Pharm Bull*, **56**, 328-31 (2008).
- 71) Chhun S, Rey E, Tran A, Lortholary O, Pons G, Jullien V. Simultaneous quantification of voriconazole and posaconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **852**, 223-8 (2007).
- 72) Chahbouni A, Wilhelm AJ, den Burger JC, Sinjewel A, Vos RM. Validated liquid chromatography-tandem mass spectroscopy method for the simultaneous quantification of four antimycotic agents in human serum. *Ther Drug Monit*, **32**, 453-7 (2010).
- 73) Baldelli S, Cattaneo D, Giodini L, Baietto L, Di Perri G, D'Avolio A, et al. Development and validation of a HPLC-UV method for the quantification of antiepileptic drugs in dried plasma spots. *Clin Chem Lab Med*, **53**, 435-44 (2015).
- 74) Morgan PE, Fisher DS, Evers R, Flanagan RJ. A rapid and simple assay for lamotrigine in serum/plasma by HPLC, and comparison with an immunoassay. *Biomed Chromatogr*, **25**, 775-8 (2011).
- 75) Franceschi L, Furlanut M. A simple method to monitor plasma concentrations of oxcarbazepine, carbamazepine, their main metabolites and lamotrigine in epileptic patients. *Pharmacol Res*, **51**, 297-302 (2005).
- 76) Greiner C, Haen E. Development of a simple column-switching high-performance liquid chromatography (HPLC) method for rapid and simultaneous routine serum monitoring of lamotrigine, oxcarbazepine and 10-monohydroxycarbazepine (MHD). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **854**, 338-44 (2007).
- 77) Contin M, Mohamed S, Candela C, Albani F, Riva R, Baruzzi A. Simultaneous HPLC-UV analysis of rufinamide, zonisamide, lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **878**, 461-5 (2010).
- 78) D'Urso A, Cangemi G, Barco S, Striano P, D'Avolio A, de Grazia U. LC-MS/MS-Based Quantification of 9 Antiepileptic Drugs From a Dried Sample Spot Device. *Ther Drug Monit*, **41**, 331-339 (2019).
- 79) Paal M, Habler K, Northoff B, Vogeser M. Comparative Routine Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid in human Plasma with HPLC-UV and Isotope Dilution LC-MS/MS. *Clin Lab*, **66** (2020). <https://www.clin-lab-publications.com/article/3313>.
- 80) Roth O, Spreux-Varoquaux O, Bouchet S, Rousselot P, Castaigne S, Rigaudeau S, et al.

- Imatinib assay by HPLC with photodiode-array UV detection in plasma from patients with chronic myeloid leukemia: Comparison with LC-MS/MS. *Clin Chim Acta*, **411**, 140-6 (2010).
- 81) Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, Conca A, Deckert J, Domschke K, Eckermann G, Egberts K, Gerlach M, Greiner C, Gründer G, Haen E, Havemann-Reinecke U, Hefner G, Helmer R, Janssen G, Jaquenoud E, Laux G, Messer T, Mössner R, Müller MJ, Paulzen M, Pfuhlmann B, Riederer P, Saria A, Schoppek B, Schoretsanitis G, Schwarz M, Gracia MS, Stegmann B, Steimer W, Stingl JC, Uhr M, Ulrich S, Unterecker S, Waschglar R, Zernig G, Zurek G, Baumann P. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry*, **51**, 9-62 (2018).
- 82) S. Zuidema, I. M. E. Desar, N. P. van Erp, W. Kievit, Optimizing the dose in patients treated with imatinib as first line treatment for gastrointestinal stromal tumours: A cost-effectiveness study. *Br J Clin Pharmacol*, **85**, 1994-2001 (2019).
- 83) Kim K, McMillin GA, Bernard PS, Tantravahi S, Walker BS, Schmidt RL. Cost effectiveness of therapeutic drug monitoring for imatinib administration in chronic myeloid leukemia. *PLoS One*, **14**, e0226552 (2019).
- 84) Abdul-Aziz MH, Alffenaar JC, Bassetti M, Bracht H, Dimopoulos G, Marriott D, Neely MN, Paiva JA, Pea F, Sjovald F, Timsit JF, Udy AA, Wicha SG, Zeitlinger M, De Waele JJ, Roberts JA; Infection Section of European Society of Intensive Care Medicine (ESICM); Pharmacokinetic/pharmacodynamic and Critically Ill Patient Study Groups of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID); Infectious Diseases Group of International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology (IATDMCT); Infections in the ICU and Sepsis Working Group of International Society of Antimicrobial Chemotherapy (ISAC). Antimicrobial therapeutic drug monitoring in critically ill adult patients: a Position Paper. *Intensive Care Med*, **46**, 1127-53 (2020).
- 85) Paal M, Heilmann M, Koch S, Bertsch T, Steinmann J, Höhl R, et al. Comparative LC-MS/MS and HPLC-UV Analyses of Meropenem and Piperacillin in Critically Ill Patients. *Clin Lab*, **65** (2019) <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2019.190210>.
- 86) McWhinney BC, Wallis SC, Hillister T, Roberts JA, Lipman J, Ungerer JP. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **878**, 2039-43 (2010).
- 87) Pinder N, Brenner T, Swoboda S, Weigand MA, Hoppe-Tichy T. Therapeutic drug monitoring of beta-lactam antibiotics - Influence of sample stability on the analysis of piperacillin, meropenem, ceftazidime and flucloxacillin by HPLC-UV. *J Pharm Biomed Anal*, **143**, 86-93 (2017).
- 88) ジャレド ダイアモンド, 倉骨 彰 (訳) . 銃・病原菌・鉄 —1万3000年にわたる

- 人類史の謎. 草思社, 東京, 2000.
- 89) 厚生労働省. 新型コロナウイルス感染症 COVID-19 診療の手引き 第 9.0 版. 2023 年 2 月 10 日.
- 90) 日本医師会 COVID-19 有識者会議. COVID-19 に対する候補薬剤及び開発状況. 2020 年 4 月 28 日. <https://www.covid19-jma-medical-expert-meeting.jp/topic/249>
- 91) Furuta Y, Takahashi K, Kuno-Maekawa M, Sangawa H, Uehara S, Kozaki K, Nomura N, Egawa H, Shiraki K. Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 981-6 (2005).
- 92) Huchting J, Winkler M, Nasser H, Meier C. Synthesis of T-705-Ribonucleoside and T-705-Ribonucleotide and Studies of Chemical Stability. *ChemMedChem*, **12**, 652-659 (2017).
- 93) Madelain V, Mentré F, Baize S, Anglaret X, Laouénan C, Oestereich L, Nguyen THT, Malvy D, Piorkowski G, Graw F, Günther S, Raoul H, de Lamballerie X, Guedj J. Modeling Favipiravir Antiviral Efficacy Against Emerging Viruses: From Animal Studies to Clinical Trials. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, **9**, 258-271 (2020).
- 94) Madelain V, Guedj J, Mentré F, Nguyen TH, Jacquot F, Oestereich L, Kadota T, Yamada K, Taburet AM, de Lamballerie X, Raoul H. Favipiravir Pharmacokinetics in Nonhuman Primates and Insights for Future Efficacy Studies of Hemorrhagic Fever Viruses. *Antimicrob Agents Chemother*, **61**, e01305-16 (2016).
- 95) Nguyen TH, Guedj J, Anglaret X, Laouénan C, Madelain V, Taburet AM, Baize S, Sissoko D, Pastorino B, Rodallec A, Piorkowski G, Carazo S, Conde MN, Gala JL, Bore JA, Carbonnelle C, Jacquot F, Raoul H, Malvy D, de Lamballerie X, Mentré F; JIKI study group. Favipiravir pharmacokinetics in Ebola-Infected patients of the JIKI trial reveals concentrations lower than targeted. *PLoS Negl Trop Dis*, **11**, e0005389 (2017).
- 96) Du YX, Chen XP. Favipiravir: Pharmacokinetics and Concerns About Clinical Trials for 2019-nCoV Infection. *Clin Pharmacol Ther*, **108**, 242-247 (2020).
- 97) Moriiwa Y, Suzuki N, Shoji A, Yanagida A. Analysis of Complexation Interactions between Metal Ions and Drugs under Pseudo-physiological pH Conditions by a High-throughput Screening Method Using a Solid-phase Extraction Cartridge. *Anal Sci*, **36**, 709-715 (2020).
- 98) Gowen BB, Sefing EJ, Westover JB, Smee DF, Hagloch J, Furuta Y, Hall JO. Alterations in favipiravir (T-705) pharmacokinetics and biodistribution in a hamster model of viral hemorrhagic fever. *Antiviral Res*, **121**, 132-7 (2015).
- 99) Irie K, Nakagawa A, Fujita H, Tamura R, Eto M, Ikesue H, Muroi N, Tomii K, Hashida T. Pharmacokinetics of Favipiravir in Critically Ill Patients With COVID-19. *Clin Transl Sci*, **13**, 880-885 (2020).
- 100) Lou Y, Liu L, Yao H, Hu X, Su J, Xu K, Luo R, Yang X, He L, Lu X, Zhao Q, Liang

- T, Qiu Y. Clinical Outcomes and Plasma Concentrations of Baloxavir Marboxil and Favipiravir in COVID-19 Patients: An Exploratory Randomized, Controlled Trial. *Eur J Pharm Sci*, **157**, 105631 (2021).
- 101) Hawman DW, Haddock E, Meade-White K, Nardone G, Feldmann F, Hanley PW, Lovaglio J, Scott D, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, Gowen BB, Feldmann H. Efficacy of favipiravir (T-705) against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in cynomolgus macaques. *Antiviral Res*, **181**, 104858 (2020).
- 102) Driouich JS, Cochin M, Lingas G, Moureau G, Touret F, Petit PR, Piorkowski G, Barthélémy K, Laprie C, Coutard B, Guedj J, de Lamballerie X, Solas C, Nougairède A. Favipiravir antiviral efficacy against SARS-CoV-2 in a hamster model. *Nat Commun*, **12**, 1735 (2021).
- 103) Kaptein SJF, Jacobs S, Langendries L, Seldeslachts L, Ter Horst S, Liesenborghs L, Hens B, Vergote V, Heylen E, Barthelemy K, Maas E, De Keyzer C, Bervoets L, Rymenants J, Van Buyten T, Zhang X, Abdelnabi R, Pang J, Williams R, Thibaut HJ, Dallmeier K, Boudewijns R, Wouters J, Augustijns P, Verougstraete N, Cawthorne C, Breuer J, Solas C, Weynand B, Annaert P, Spriet I, Vande Velde G, Neyts J, Rocha-Pereira J, Delang L. Favipiravir at high doses has potent antiviral activity in SARS-CoV-2-infected hamsters, whereas hydroxychloroquine lacks activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **117**, 26955-26965 (2020).
- 104) Guedj J, Piorkowski G, Jacquot F, Madelain V, Nguyen THT, Rodallec A, Gunther S, Carbonnelle C, Mentré F, Raoul H, de Lamballerie X. Antiviral efficacy of favipiravir against Ebola virus: A translational study in cynomolgus macaques. *PLoS Med*, **15**, e1002535 (2018).
- 105) Doi Y, Hibino M, Hase R, Yamamoto M, Kasamatsu Y, Hirose M, Mutoh Y, Homma Y, Terada M, Ogawa T, Kashizaki F, Yokoyama T, Koba H, Kasahara H, Yokota K, Kato H, Yoshida J, Kita T, Kato Y, Kamio T, Kodama N, Uchida Y, Ikeda N, Shinoda M, Nakagawa A, Nakatsumi H, Horiguchi T, Iwata M, Matsuyama A, Banno S, Koseki T, Teramachi M, Miyata M, Tajima S, Maeki T, Nakayama E, Taniguchi S, Lim CK, Saijo M, Imai T, Yoshida H, Kabata D, Shintani A, Yuzawa Y, Kondo M. A Prospective, Randomized, Open-Label Trial of Early versus Late Favipiravir Therapy in Hospitalized Patients with COVID-19. *Antimicrob Agents Chemother*, **64**, e01897-20 (2020).
- 106) Udwardia ZF, Singh P, Barkate H, Patil S, Rangwala S, Pendse A, Kadam J, Wu W, Caracta CF, Tandon M. Efficacy and safety of favipiravir, an oral RNA-dependent RNA polymerase inhibitor, in mild-to-moderate COVID-19: A randomized, comparative, open-label, multicenter, phase 3 clinical trial. *Int J Infect Dis*, **103**, 62-71 (2021).
- 107) Shrestha DB, Budhathoki P, Khadka S, Shah PB, Pokharel N, Rashmi P. Favipiravir versus other antiviral or standard of care for COVID-19 treatment: a rapid systematic

- review and meta-analysis. *Virol J*, **17**, 141 (2020).
- 108) Ivashchenko AA, Dmitriev KA, Vostokova NV, Azarova VN, Blinow AA, Egorova AN, Gordeev IG, Ilin AP, Karapetian RN, Kravchenko DV, Lomakin NV, Merkulova EA, Papazova NA, Pavlikova EP, Savchuk NP, Simakina EN, Sitdekov TA, Smolyarchuk EA, Tikhomolova EG, Yakubova EV, Ivachtchenko AV. AVIFAVIR for Treatment of Patients With Moderate Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Interim Results of a Phase II/III Multicenter Randomized Clinical Trial. *Clin Infect Dis*, **73**, 531-534 (2021).
- 109) Lou Y, Liu L, Yao H, Hu X, Su J, Xu K, Luo R, Yang X, He L, Lu X, Zhao Q, Liang T, Qiu Y. Clinical Outcomes and Plasma Concentrations of Baloxavir Marboxil and Favipiravir in COVID-19 Patients: An Exploratory Randomized, Controlled Trial. *Eur J Pharm Sci*, **157**, 105631 (2021).
- 110) Khamis F, Al Naabi H, Al Lawati A, Ambusaidi Z, Al Sharji M, Al Barwani U, Pandak N, Al Balushi Z, Al Bahrani M, Al Salmi I, Al-Zakwani I. Randomized controlled open label trial on the use of favipiravir combined with inhaled interferon beta-1b in hospitalized patients with moderate to severe COVID-19 pneumonia. *Int J Infect Dis*, **102**, 538-543 (2021).
- 111) Wang Y, Zhong W, Salam A, Tarning J, Zhan Q, Huang JA, Weng H, Bai C, Ren Y, Yamada K, Wang D, Guo Q, Fang Q, Tsutomu S, Zou X, Li H, Gillesen A, Castle L, Chen C, Li H, Zhen J, Lu B, Duan J, Guo L, Jiang J, Cao R, Fan G, Li J, Hayden FG, Wang C, Horby P, Cao B. Phase 2a, open-label, dose-escalating, multi-center pharmacokinetic study of favipiravir (T-705) in combination with oseltamivir in patients with severe influenza. *EBioMedicine*, **62**, 103125 (2020).
- 112) Zeitlinger M, Koch BCP, Bruggemann R, De Cock P, Felton T, Hites M, Le J, Luque S, MacGowan AP, Marriott DJE, Muller AE, Nadrah K, Paterson DL, Standing JF, Telles JP, Wöfl-Duchek M, Thy M, Roberts JA; PK/PD of Anti-Infectives Study Group (EPASG) of the European Society of Clinical Microbiology, Infectious Diseases (ESCMID). Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Antiviral Agents Used to Treat SARS-CoV-2 and Their Potential Interaction with Drugs and Other Supportive Measures: A Comprehensive Review by the PK/PD of Anti-Infectives Study Group of the European Society of Antimicrobial Agents. *Clin Pharmacokinet*, **59**, 1195-1216 (2020).
- 113) Theil EC. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem*, **56**, 289-315 (1987).
- 114) Beck G, Ellis TW, Habicht GS, Schluter SF, Marchalonis JJ. Evolution of the acute phase response: iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an echinoderm ferritin molecule. *Dev Comp Immunol*, **26**, 11-26 (2002).
- 115) Taneri PE, Gómez-Ochoa SA, Llanaj E, Raguindin PF, Rojas LZ, Roa-Díaz ZM, Salvador D Jr, Groothof D, Minder B, Kopp-Heim D, Hautz WE, Eisenga MF, Franco OH,

- Glisic M, Muka T. Anemia and iron metabolism in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol*, **35**, 763-773 (2020).
- 116) Irie K, Nakagawa A, Fujita H, Tamura R, Eto M, Ikesue H, Muroi N, Fukushima S, Tomii K, Hashida T. Population pharmacokinetics of favipiravir in patients with COVID-19. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, **10**, 1161-1170 (2021).
- 117) Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, Hohmann E, Chu HY, Luetkemeyer A, Kline S, Lopez de Castilla D, Finberg RW, Dierberg K, Tapson V, Hsieh L, Patterson TF, Paredes R, Sweeney DA, Short WR, Touloumi G, Lye DC, Ohmagari N, Oh MD, Ruiz-Palacios GM, Benfield T, Fätkenheuer G, Kortepeter MG, Atmar RL, Creech CB, Lundgren J, Babiker AG, Pett S, Neaton JD, Burgess TH, Bonnett T, Green M, Makowski M, Osinusi A, Nayak S, Lane HC; ACTT-1 Study Group Members. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. *N Engl J Med*, **383**, 1813-1826 (2020).
- 118) Spinner CD, Gottlieb RL, Criner GJ, Arribas López JR, Cattelan AM, Soriano Viladomiu A, Ogbuagu O, Malhotra P, Mullane KM, Castagna A, Chai LYA, Roestenberg M, Tsang OTY, Bernasconi E, Le Turnier P, Chang SC, SenGupta D, Hyland RH, Osinusi AO, Cao H, Blair C, Wang H, Gaggar A, Brainard DM, McPhail MJ, Bhagani S, Ahn MY, Sanyal AJ, Huhn G, Marty FM; GS-US-540-5774 Investigators. Effect of Remdesivir vs Standard Care on Clinical Status at 11 Days in Patients With Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, **324**, 1048-1057 (2020).
- 119) Mishima E, Anzai N, Miyazaki M, Abe T. Uric Acid Elevation by Favipiravir, an Antiviral Drug. *Tohoku J. Exp. Med*, **251**, 87-90 (2020).
- 120) Koseki T, Nakajima K, Iwasaki H, Yamada S, Takahashi K, Doi Y, Mizuno T. Baseline uric acid levels and steady-state favipiravir concentrations are associated with occurrence of hyperuricemia among COVID-19 patients. *Int J Infect Dis*, **115**, 218-223 (2022).
- 121) Wang, M., Cao, R., Zhang, L. et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res*, **30**, 269-271 (2020).
- 122) Oda K, Uchino S, Kurogi K, Horikawa M, Matsumoto N, Yonemaru K, Arakaki H, Katsume T, Matsuyama K, Katanoda T, Narita Y, Iwamura K, Jono H, Saito H. Clinical evaluation of an authorized medical equipment based on high performance liquid chromatography for measurement of serum voriconazole concentration. *J Pharm Health Care Sci*, **7**, 42 (2021).
- 123) 赤嶺 由美子, 松下 美由紀, 森川 悟, 三浦 昌朋. 腎移植患者におけるミコフェノール酸血中濃度に対する高速液体クロマトグラフ LM1010 の精度評価. *Yakugaku Zasshi*, **143**, 377-383 (2023).
- 124) 森川 剛, 大谷 典生, 岡田 光貴, 奈女良 昭, 藤田 友嗣, 三瀬 雅史, 山口 浩

明， 齊藤 剛． 機器分析ハンズオンセミナーの実施報告． *中毒研究*, **35**, 199-204 (2022).