

	もりかわ ごう
氏名（本籍）	森川 剛（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 385 号
学位授与の日付	令和 5 年 7 月 12 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	（主査）教授 柳田 顕郎 教授 下枝 貞彦 教授 山折 大 教授 袴田 秀樹

## 論文内容の要旨

治療薬物モニタリング（TDM）や急性中毒時の分析業務とエビデンスの構築において、定量分析技術の基盤が不可欠である。その分析技術はリガンド結合法（Ligand Binding Assay: LBA）と液体クロマトグラフィー（LC）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点や試薬費が安くない点、抗体等の試薬がない項目は測定できない点、などの欠点がある。一方、高速液体クロマトグラフィー（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の理由により、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、多くの病院は、血中濃度分析の外部委託を推進し、院内での分析業務を縮小している。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。そもそも血中薬物濃度は、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自体の価値が低下してしまう懸念がある。

ここで筆者らは、改めて紫外可視吸光検出器を備えた HPLC-UV 法の可能性を検討した。HPLC-UV 法は 1980 年代～90 年代に臨床現場で広く使用されたが、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 法は分析初心者でも扱いやすく安定性に優れた分析法であり、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び活躍できるのではないだろうか。

このような背景の元、本博士論文研究では、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 章では本分析法の手順と装置の最適化を行い、第 2 章では院内における実用

性を検証した。さらに第3章では、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）治療候補薬であったファビピラビル（FPV）も測定項目の追加拡張ができるか検討した。そして、第4章では、自施設（北信総合病院）の患者検体を用いてFPVの血中濃度を測定し、その変動因子を探索した。

## 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<sup>1)</sup>

病院内での迅速な血中濃度測定法を構築する上で、下記①～④を基本コンセプトとして開発に着手した。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定量分析法として、薬物毎に、遠心用スピニングカートリッジを用いた固相抽出（solid-phase extraction, SPE）法による前処理条件と、ODSモノリスカラムを備えた逆相HPLC-UV検出条件を最適化した。被検薬物の血中濃度定量は以下の手順で行った。1) 薬物標準液をHPLC分析して、一点検量線を作成した。2) 薬物を含む血清をMonoSpinカートリッジ（C18, C18-CX）で固相抽出処理してから、溶出液をHPLC分析して、前出の検量線から血中濃度を算出した（Fig. 1）。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 μg/mLの範囲であった。各薬物の治療有効濃度領域内の定量バリデーションも良好であった。

## 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

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、ボ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ニングカートリッジの通液性を考慮して、遠心時間

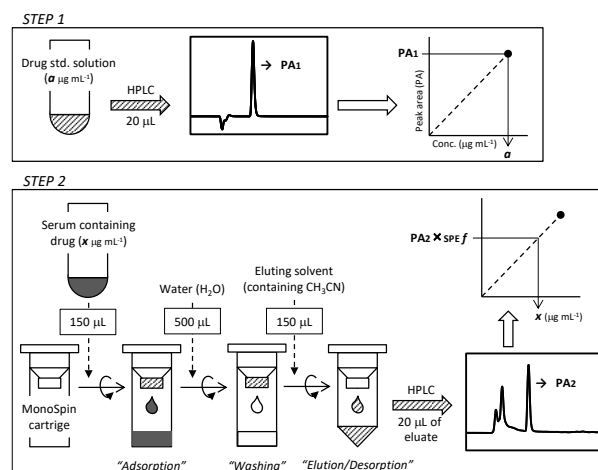


Fig.1 Schematic procedure of the present method for in-hospital quantitation

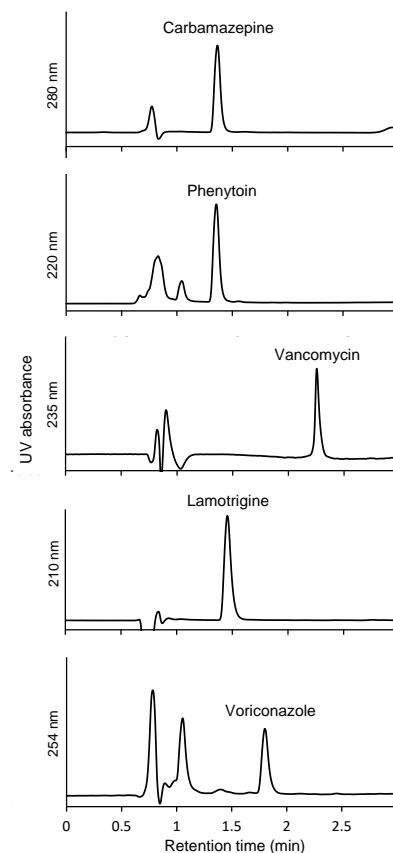


Fig. 2 HPLC-UV chromatogram of five drugs detected from patient sera by the present quantification method.

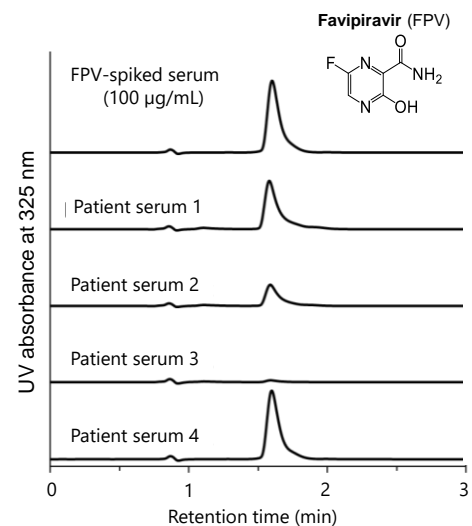
や血清添加前にメンブランフィルターを用いる点を改良した。また、本法以外の血中濃度定量法として、通常業務として院内の自動分析装置 (cobas<sup>®</sup>) による測定と外注 (HPLC-MS/MS) による測定も同時に行い、本法で得た薬物定量値と cobas および HPLC-MS/MS での検査結果を比較評価した。

**Fig. 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各薬物の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。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、熟練を要さずに実用可能な 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。

### 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<sup>2)</sup>

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 5 M 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% CH<sub>3</sub>CN 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 (**Fig. 3**)。一方で、FPV は Fe<sup>3+</sup>および Cu<sup>2+</sup>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** Comparison of RP-HPLC chromatograms of FPV in the SPE eluate of four different patient serum samples.

### 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<sup>3)</sup>

第 3 章で測定した 4 例の患者のように FPV の血中濃度には大きな個人差があるが、その要因は

十分に明らかになっていない。そのため、FPV の血中濃度に影響を与える因子を探索する目的で、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 の血中濃度は定常状態のトラフ値で行い、1 症例につき複数回測定できた場合はその平均値を算出した。次に対数変換を行った血中濃度（トラフ値）を従属変数とする線形回帰分析を実施した。FPV は  $\text{Fe}^{3+}$  と選択的に錯体を形成するため、血清フェリチン濃度との関連性も検討した。また、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ことが知られている。経時的（投与前後）に測定された尿酸値に対して、血中 FPV 濃度が高値群（20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上）と低値群（20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  未満）で差があるかどうかを検討するために、尿酸値を従属変数とし、投与前後と血中 FPV 濃度の高低およびその交互作用項を固定効果とする反復測定分散分析で解析した。

単変量で有意変数をステップワイズ法で投入したところ、フェリチンのみが独立して血中 FPV 濃度に影響を与えている因子であることが分かった。本研究により、COVID-19 感染による高フェリチン血症の患者では、血中 FPV 濃度が顕著に低下することが判明した（Fig. 4）。さらに、血中 FPV 濃度が 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の群では投与前後で有意に尿酸値の上昇を認め、さらにその上昇度合いは、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  未満群と比べて有意に大きいことが分かった（Table 1）。これは逆説的に FPV 投与患者で尿酸値の顕著な上昇を認めれば、FPV 血中濃度は 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上である可能性が示唆される。

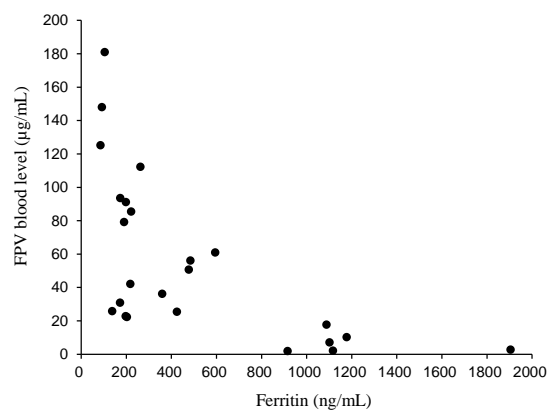


Fig. 4 Plots of blood FPV levels of all patients (n = 27) against their serum ferritin levels.

FPV の投与量や血中 FPV 濃度と有効性・安全性に関して追加検討する価値があると考え、Table 1 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 $\pm$ SD]			p value
		Before FPV administration	After FPV administration	Change (after administration)	
Low blood FPV level group (less than 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	6	5.8 $\pm$ 1.8	6.6 $\pm$ 2.2	0.8 $\pm$ 1.3	0.222
High blood FPV level group (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or more)	19	5.1 $\pm$ 1.4	9.3 $\pm$ 1.8	4.2 $\pm$ 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.

## 総括

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 や急性中毒時の薬毒物分析において、院内で簡便かつ迅速に活用でき、LBA 法などと組み合わせて、より多くの項目の薬物

血中濃度の測定が可能になる。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。今後、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期待する。

#### 【研究結果の掲載誌】

- 1) 森川 剛, 返町 美穂, 田村 和季, 守岩 友紀子, 東海林 敦, 岡澤 香津子, 柳田 顕郎, *分析化学*, 68, 473-81 (2019).
- 2) Y. Moriiwa<sup>#</sup>, G. Morikawa<sup>#</sup>, K. Okazawa, A. Yanagida, *Anal Sci.*, 37, 1301-4 (2021). <sup>#</sup>equally contributed
- 3) G. Morikawa, *et al.* 他 9 名, *J Infect Chemother.*, 28, 73-7 (2022).

## 【 審 査 要 旨 】

森川剛氏の博士学位申請論文は、病院薬剤師としての立場から、病院等の臨床現場における治療薬物モニタリング（TDM）や急性中毒時の業務を想定して、できるだけ多くの品目の薬物血中濃度を迅速かつ簡便に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と、実臨床への応用を目的として遂行した研究内容を全4章に亘ってまとめたものである。

第1章では、病院内での迅速な血中濃度定量法を構築するにあたり、1) 一般病院の薬剤師や臨床検査技師が日常業務として扱える手法であり、2) 高額で特殊な装置や試薬を必要とせず、3) 多品目の薬物に対して適用可能かつ前処理も含めた手順がほぼ同一で、4) 多検体処理が可能な半自動化が見込める手法、などを基本コンセプトとする開発に着手した。その結果、遠心用スピナーカートリッジを用いた固相抽出法による血清前処理と ODS モノリスカラムを備えた逆相 HPLC-UV 装置を組み合わせたシンプルな定量分析プラットフォームを考案し、15 品目の薬物に対する定量分析の最適化条件を確立した。さらに、各薬物の添加血清を用いて、構築した分析法のバリデーションを行った。

第2章では、構築した定量分析プラットフォームについて、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。被検薬物として、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、ポリコナゾールの5品目を選択し、各薬物を服用している患者の血清を同プラットフォームの分析試料に供した結果、各薬物の HPLC プロファイルや定量値に異常は見られず、薬剤師や臨床検査技師による定量値の繰り返し精度も良好であることを確認した。また、本法と既存手法（LBA 法や HPLC-MS/MS 法）の定量値の比較においても良好な相関性が認められた。

第3章では、COVID-19 治療候補薬の主成分であるファビピラビル（FPV）の院内迅速定量に、本プラットフォームを活用できるかどうか検討した。まず、FPV 添加血清に対する固相抽出条件と逆相 HPLC 分析条件を最適化してから、定量バリデーションを行った。さらに、病院内で FPV を経口投与した COVID-19 の患者（4名）の血中 FPV 濃度（トラフ値）を定量した結果、大きな個人差が認められた。一方で、FPV は  $\text{Fe}^{3+}$  および  $\text{Cu}^{2+}$  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源性因子と血中 FPV 濃度の関連が示唆された。

第4章では、FPV の血中濃度に影響を与える因子を探索する目的で、自施設内において2020年4月～12月までに COVID-19 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。その結果、本プラットフォームにて測定した各患者の血中 FPV 濃度（トラフ値）と相関する因子として、血中の鉄貯蔵タンパク質であるフェリチン濃度が強い影響を及ぼしており、高フェリチン血症の COVID-19 患者では血中 FPV 濃度が顕著に低下することが判明した。さらに、血中 FPV 濃度が  $20 \mu\text{g/mL}$  以上の群では、投与前後で有意に尿酸値の上昇を認める現象も新たに見出した。

以上のように、森川氏は多品目の薬物血中濃度定量を想定した実用的な HPLC 分析手順と分析装置の最適化を実現させている。また、最適化した手法を病院の患者血清中の薬物濃度分析へ適用し、臨床現場における本手法の実用性と有用性を明確に示すとともに、本手法が全く新規な薬物の血中濃度定量へも容易に拡張できることや、臨床現場で得た薬物血中濃度の定量データに基

づいてこれまで未知であった薬物相互作用の新たな事例を示すなどの発展的な研究成果が得られている。よって、本論文は、博士（薬学）の学位論文として相応しい内容を有するものと判断する。