

氏 名 (本籍) ^{やま}山 ^{ぐち}口 ^{じゅん}順 ^{いち}一

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 第 4 4 9 号

学位授与年月日 平 成 13 年 11 月 21 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 液体クロマトグラフィー／タンデムマススペクトロメ
トリーの高感度化を目的とする効率的イオン生成法
とその薬物動態研究への応用

論文審査委員 (主 査)
教授 後 藤 順 一 教授 寺 崎 哲 也
教授 山 添 康

論文内容要旨

薬物は、服用後体内に吸収され、全身に分布、作用部位に到達したのち、代謝を受け、最終的に体外へ排泄される。これら一連の過程は、薬物による生体側の反応、すなわち薬効と毒性の発現と密接に関連している。それゆえ、薬物の体内動態の解明は、有効性と安全性に優れる薬物の開発上、極めて重要である。

こうした薬物の体内動態研究には、生体内に存在する微量薬物とその代謝物の定量的解析が不可欠となる。従来、こうした目的に、免疫学的測定法や各種機器分析法、すなわち、GC、HPLC、GC/MS、LC/MS、LC/MS/MS 等が用いられている。なかでも、サーモスプレーイオン化 (TSI) 法、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法及び大気圧化学イオン化 (APCI) 法の実用化により爆発的に普及した液体クロマトグラフィー／タンデムマススペクトロメトリー (LC/MS/MS) は、不揮発性で極性の高い化合物をも直接測定することも可能であり、しかも、卓越した感度、分離能、選択性を有するため、薬物の体内動態研究のみならず、生命科学研究においても汎用されている。しかし、本法は、検出感度が測定対象物自身の特性のみならず、移動相の種類や生体試料中の夾雑成分による影響を非常に強く受ける。

本研究では、こうした問題を克服し生体内微量物質の高感度分析法を構築するために必須な、①測定対象物の効率的イオン化と、②生体試料中の夾雑成分によるイオン化効率の低下 (マトリックス効果) の回避法について検討し、その結果を生体内微量物質の測定に適用した。

第1章 イオン化効率の向上と高感度化

本章では、TSI 及び ESI 法のそれぞれについてイオン化効率に難のある化合物を取りあげ、それらの効率的イオン化法を検討した。

第1節 TSI における熱不安定抱合代謝物のイオン化効率の向上

TSI は、LC からの溶出液を酢酸アンモニウム等の電解質とともに加熱キャピラリーから真空下に噴霧することにより、生成した電解質イオンを反応イオンとし、共存する微量測定対象物分子をイオン化するという手法である。本イオン化法を採用した LC/TSI-MS/MS により高感度測定法を構築するには、測定対象物の分子量を反映するイオン等、測定上有利なイオン種を効率良く生成させることが必要となる。しかし、薬物や内因性化合物の抱合体のような熱に不安定な化合物のイオン化効率は著しく低い。そこで本節では、acetaminophen の各種抱合体を例に、熱に不安定な化合物の効率的イオン化法について検討を行った。その結果、従来至適条件とされていた霧化温度、すなわち、移動相由来のイオン強度が最大となる霧化温度よりも若干低い温度条件下でイオン化させることにより、移動相の組成、イオン源の温度等、他の測定条件に何ら変更を加えることなく、acetaminophen の各種抱合体の熱分解を抑え、適切な LC/TSI-MS/MS 分析が可能となることを見い出した。

第2節 ESIにおける弱酸性化合物のイオン化効率の向上

ESIは、LCからの溶出液を、数kVの高電圧を印加した金属ノズルから大気圧下で噴霧することにより生成した帯電液滴を溶媒分子の脱離過程を通じてさらに微細化し、最終的に気相中にイオン分子を蒸発させるという方法である。ESIは、①TSIやAPCI等の加熱噴霧方式ではイオン化の困難な熱不安定イオン性化合物にもそのまま適用可能なこと、②分子量数十万Daのペプチドやタンパク質の測定も可能なことから、今日のバイオメディカル領域において、LC/MS/MSのイオン化法として最も汎用されている。本法で測定対象物をより効率良くイオン化するには、移動相に添加する電解質の濃度をできるだけ稀薄とし、メタノールやアセトニトリル等の有機溶媒組成をできるだけ高くすることが有利とされる。しかし、相互分離を優先する通常のLC分析では、ESIに対する理想的移動相とはかけ離れた条件を採用せざるを得ず、しばしばイオン化効率が犠牲となる。特に、弱酸性化合物を対象とする場合は典型的であるが、その効果的な解決策は未だ見出されていない。そこで本節では、ibuprofenを例にこの問題の克服法について検討を加えた。その結果、2-(2-メトキシエトキシ)エタノール(2-MEE)を移動相(50mM酢酸/酢酸アンモニウム緩衝液(pH4.4))にポストカラムモードで添加することにより、酢酸アニオンに起因するイオン化抑制現象を効果的に改善することができ、LCの分離能を犠牲にすることなく、ESIの応答を約100倍向上させられることが判明した。

第3節 新規抗リウマチ薬 esonarimod のラットにおける代謝プロファイルの解明

抗リウマチ薬としての有用性が期待される esonarimod は、分子内にチオアセチル基を有しており、体内に吸収されたのち、速やかに脱アセチル化を受け、メルカプト基を持つ薬効本体、脱 acetyl esonarimod (M-I) に変換される。ところが、本化合物のラットにおける毒性は、チオール化合物である D-penicillamine よりも低い。本節では、先に提案した 2-MEE のポストカラム添加 LC/ESI-MS/MS を、弱酸性化合物である esonarimod のラット体液中代謝物の分析に適用した。その結果、通常の ESI 条件では困難であった代謝物の同定が可能となり、解明した代謝プロファイルから、本薬は、ラットにおいて、通常のチオール化合物に特徴的なジスルフィド関連代謝物にはほとんど変換しないものと結論された。この結果は、ラット体内における M-I と生体高分子とのジスルフィド結合性が、他のチオール化合物に比べ著しく低いことを示唆しており、ラットにおける本薬の毒性が低いことと良く符合するものと考えられた。

第2章 マトリックス効果の抑制と高感度化

本章では、新規 acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) 阻害剤、TS-962 の生体試料中濃度測定をモデルケースとし、マトリックス効果の抑制による高感度測定法に関する検討を行った。

第1節 LC/APCI-MS/MSによるラット、ウサギ血漿中TS-962の濃度測定

マトリックス効果の回避には、適切なサンプルクリーンアップの実施が何よりも重要となる。しかし、濃縮、乾固、試料再溶解のステップを含む一般的なオフラインのクリーンアップは、多検体の迅速測定に

は不向きであり、pharmacokinetics (PK) の検討に伴う生体試料中の薬物、代謝物の濃度測定 (PK-測定) の場合、大きな問題となる。そればかりか、操作中における測定対象物の吸着や分解による損失の危険性も高く、高感度分析には不利と言える。本節では、こうした問題を克服するため、メタノール除タンパク上清の直接注入を可能とするハイスループット型オンラインクリーンアップシステムを構築し、これを TS-962 のラット及びウサギ血漿中の濃度測定法に応用した。本節にて構築したオンラインクリーンアップシステムは、オフライン固相抽出カートリッジからの溶出液はもとより、有機溶媒含量の極めて高い水溶性有機溶媒による除タンパク液の多量注入をも可能とするため、LC/MS/MS を用いた高感度ハイスループット分析に威力を発揮するものと期待される。

第2節 LC/ESI-MS/MS によるウサギ大動脈組織中 TS-962 の測定

正イオン検出 ESI モードにより生体試料中の非イオン性化合物を測定する場合、selected reaction monitoring (SRM) に不適切なアルカリ金属付加イオンが生成しやすいことに加え、マトリックス効果による測定対象物の著しい感度低下が問題となる。本節では、非イオン性化合物である TS-962 の組織中濃度測定を例に、こうした諸問題に検討を加えた。その結果、アルカリ金属付加イオン生成の回避には、移動相へのトリフルオロ酢酸の添加が、また、マトリックス効果の改善には、前節の結果を基に実施したオンラインクリーンアップが極めて効果の高いことを示した。次いで本法を適用し、TS-962 投与後のウサギ大動脈組織中濃度測定法を開発するとともに、TS-962 をウサギに反復経口投与後の奏効部位における薬物濃度を測定した。その結果、大動脈組織中の TS-962 濃度は、ウサギ大動脈より調製されたミクロソーム ACAT 活性に対する 50% 阻害濃度値を完全に上回る値を与え、その対血漿中濃度は、胸部大動脈で 10 倍、また、腹部大動脈においても胸部と同等の値を示した。この結果から、本薬は奏効部位である大動脈組織へ良好に移行、集積するものと考えられ、本薬の抗動脈硬化作用に基づく虚血性心疾患治療薬としての有用性が示唆された。

以上、本論文は、LC/MS/MS により生体試料中微量物質の高感度測定法を構築する上で解決が求められている問題に焦点をあて、それらの克服法を呈示したものである。本研究で得られた成果は、LC/MS/MS による薬物の体内動態解析法の開発に際し、今後一般に広く利用されるものと期待される。

審査結果の要旨

今日、薬物動態解析に高速液体クロマトグラフィー（LC）と質量分析法（LC）とを組み合わせた LC/MS が大きな威力を発揮している。とりわけ、質量分析計を2台つなげて用いる LC/タンデムマススペクトロメトリ（MS/MS）は、特徴的なプレカーサーイオンとプロダクトイオンを利用する selected reaction monitoring（SRM）により、バックグラウンドの低下とも相俟って、選択性、特異性、感度に優れる生体内微量物質の測定が可能となる。しかし、本法においても、高感度分析には、イオン化の際に、測定対象物に特徴的なイオンを高い効率で生成させることが不可欠である。さらに、生体試料の測定では、多量の共存物質によりイオン化が抑制されるマトリックス効果が大きな問題となる。本研究では、LC/MS/MS に適した効率的イオン生成法とマトリックス効果の回避に検討を加え、生体内微量薬物の高感度分析に適用した。

まず thermospray ionization（TSI）と electrospray ionization（ESI）における効率的イオン化法に検討を加えた。TSI は、LC からの溶出液を電解質とともに加熱キャピラリーからイオン化室に真空下噴霧することにより、測定対象物分子をイオン化する。この時、加熱温度は、95%程度の溶媒が気化する温度が最適とされ、至適霧化温度と呼ばれている。しかし、不揮発性の抱合体ではしばしば適切なイオンが検出されない。この原因として、キャピラリー先端部での熱分解と推測し、加熱温度を下げることによってこれを回避できることを実証し、従来困難とされた薬物の抱合代謝物の高感度測定を可能とした。

ESI は、LC からの溶出液を高電圧をかけた金属ノズルから大気圧下イオン化室に噴霧することにより溶質をイオン化する。この時、移動相にイオン化しやすい電解質が含まれていると、測定対象物のイオン化が抑制され、高感度が得にくい。しかし、電解質の添加は LC における分離に極めて重要である。一般に LC/MS では、炭酸アンモニウム塩が揮発性の電解質として移動相に添加される。そこで、イオン化室において電解質を気化させれば測定対象物のイオン化の抑制を回避できるとの仮説をたて、沸点の比較的高い 2-(2-メトキシエトキシ)エタノールをポストカラムモードで移動相に加える手法を考案し、高いイオン化効率の獲得に成功するとともに、新規抗リウマチ薬の代謝プロファイルの解析に応用した。

次に、マトリックス効果の除去に吟味を加え、メタノール除蛋白上清を直接注入するハイスループットオンラインクリーンアップシステムを考案し、新規 ACAT 阻害剤の血中濃度測定に適用した。

以上、本研究は、LC/MS/MS における高効率的イオン生成法とマトリックス効果回避法に検討を加え、薬物代謝分析に新たな知見を加えたものである。よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。