

氏名	石谷雅樹
生年月日	
本籍	広島県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第251号
学位授与の日付	2002年9月30日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	微量薬物の代謝並びに酵素反応解析への質量分析の応用研究
論文審査委員(主査)	島田 和武(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	原田 健一(名城大学・教授) 大熊 勝治(薬学部・教授) 横井 毅(医学系研究科・教授) 東 達也(薬学部・講師)

学位論文要旨

Summary

We studied the practical application of mass spectrometry (MS) to the identification of metabolites and the quantification of drugs given in low doses (vitamin D derivatives, OCT), and a new application of MS to the dynamics study of a drug-metabolizing enzyme (glutathione S-transferase, GT).

The most effective MS methods were studied using some OCT derivatives to identify plasma metabolites following administration of OCT to rats. GC-electron ionization (EI) /MS and LC-atmospheric pressure chemical ionization (APCI) /MS were selected to achieve the purpose and shown to have distinct advantages: GC-EI/MS provides much structural information while LC-APCI/MS has higher sensitivity. Taking advantage of both these characteristics allowed us to identify 7 metabolites including a new one for vitamin D, the 17-hydroxy form. For the sensitive quantification of OCT in human plasma, selected reaction monitoring (SRM) by LC-electrospray ionization (ESI) /MS was selected, which was the first application for the quantification of vitamin D. It offered higher sensitivity, shorter analysing time and simpler pre-treatment of plasma compared with RIA which is routinely used for the quantification of OCT. Next, for the dynamics study of glutathione (GSH) conjugation by GT, quadrupole-time of flight mass spectrometer (Q-ToF) with ESI was selected as the MS method of choice. The high sensitivity, high resolution, MS-MS and wide range of mass measurement of ESI Q-ToF facilitated the detection of noncovalent association between GT homodimer and the ligands (GSH, product or inhibitor) at a physiological level (5 μ M). Monitoring noncovalent ion species by time course study provided helpful information to elucidate the dynamics of GSH conjugation.

The practical application of an efficient combination of established MS methods and the new application using Q-ToF to the analysis of drug-metabolizing enzymes will enable us to evaluate accurately the metabolism of low concentrations of drugs.

1. はじめに

新薬開発における薬物動態研究の位置付けは、近年とみにその重要性を増している。それは、薬効・毒性と薬物濃度あるいは代謝物濃度との関係を創薬の各段階で慎重に見極めたうえで次の段階に進むことが重要であると認識されてきたからである。したがって、失敗の少ない新薬開発を目指すには、医薬品開発の初期から後期の各段階において目的に応じた種々の薬物動態試験を行い、それらを正確に分析し評価することがますます重要となった。これまでも創薬の各段階においてそれぞれ異なる動態・代謝実験項目が評価されているが、その中心的な分析手段として質量分析法 (MS) が活用されている。したがって、それぞれの実験項目についてMSを用いていかに早く正確に評価できるか

が新薬開発の重要な成功要因となる。一方でゲノム創薬を主流とした最近の新薬開発では強力な薬理活性を有する薬物を扱うことが多く、ますます低用量化の傾向となり、血中薬物推移や代謝物解析等の動態・代謝項目を正確に評価することが困難となった。一方、MSのイオン化法や質量分離系は多様化しており、各動態・代謝実験項目に対してどの組み合わせがその目的に最も効果的であるかを見極めることや、MSの有効な活用法を開発していくことが新薬開発にとって必須となった。

以上の背景を基に本論文では、まず、低投与量モデル薬物としてビタミンD誘導体、22-oxacalcitriol (OCT), を用いて、MSを基盤技術とした代謝及び動態の検討を試みた。すなわち、GC-MS及びLC-MSを用いてそれぞれのイオン化法や質量分離系の特徴を最大限に活用することにより、高感度かつ構造解析に有用な代謝物同定法 (第1章) 並びに選択性の高い微量定量法の開発 (第2章) を行った。次に、薬物代謝酵素反応の動的解析へMSを応用した。モデル薬物代謝酵素としては、酵素反応速度解析やX線結晶解析等の手法を用いた情報が豊富であり、新規分析法の妥当性評価が容易なヒトグルタチオン-Sトランスフェラーゼ α 1-1 (GT) を選択し、最近開発されたquadrupole-time of flight型質量分析装置 (Q-Tof MS) を用いて酵素とそのリガンド間非共有結合体の直接分析並びにグルタチオン (GSH) 抱合反応の動的変化の解明を企てた (第3章)。

2. GC-MS及びLC-MSによるビタミンD誘導体OCTの代謝物の同定 (第1章)

OCTは、活性型ビタミンD₃である1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD₃に比べ薬効が強く副作用であるカルシウム作用が弱いという特徴を有し、副甲状腺機能亢進症及び乾癆治療薬として開発された医薬品である。OCTの予想臨床投与量は成人一人当たり2.5~10 μ gであり、現在市場にある薬物の中でも超低投与量薬物に分類される。従来のビタミンD誘導体の代謝研究は、検出感度の問題からほとんどの場合*in vitro*で行われ、薬効量付近の*in vivo*での代謝検討は困難であった。

著者らは、実際の生体試料での測定前に、従来からビタミンD誘導体の分析に使用されているelectron ionization (EI) を用いたGC-MS (セクター型) と近年ステロイドの分析でよく用いられるようになったatmospheric pressure chemical ionization (APCI) を用いたLC-MS (四重極型) の両分析法を選択し、OCTと予想代謝物 (合成品) のそれらに対する感度及び構造情報に対する特性を比較した。結果として、GC-EI/MSではOCT誘導体の分子イオンだけでなく構造を反映するフラグメントイオンが多数みられ、代謝物の構造を解析するために多くの構造情報が得られること

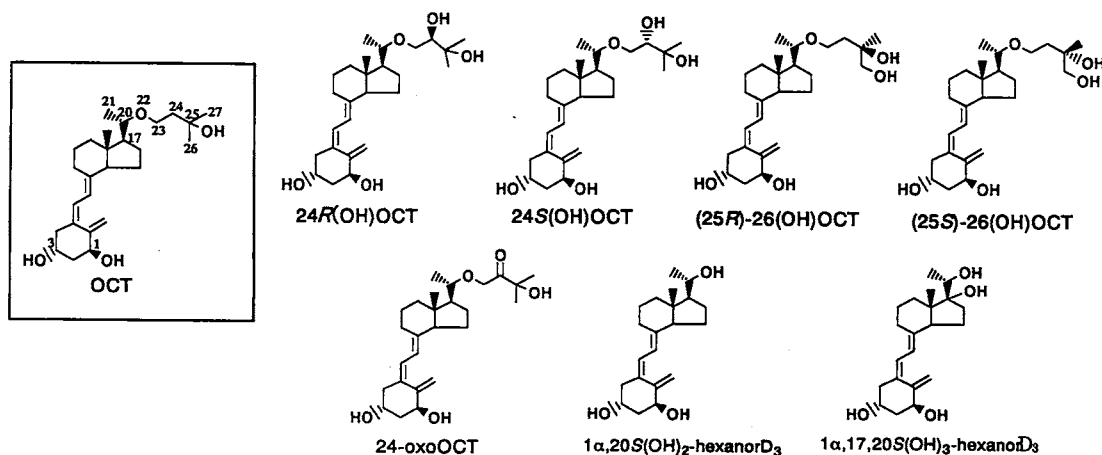


Fig. 1. Identified metabolites in rat plasma using GC-MS and LC-MS

がわかった。これに対し、LC-APCI/MSでは、分子量関連イオンの情報に比べ代謝物の構造を推定するのに有効なフラグメントイオン情報は少なかった。しかし、GC-EI/MSの1/10程度の化合物量でマススペクトルが得られ、感度面ではLC-APCI/MSがGC-EI/MSより優れていることがわかった。したがって、実際の生体試料を用いた測定では、両技術を併用することにより、単独では得られなかった情報を引き出すことに成功した。しかしながら、実際には、ラットに10 µg/kg (病態モデルラット薬効試験で用いる最大用量；静脈内投与) のOCTを投与後2時間の血漿中全代謝物を直接分析するには、今回確立したGC-MS及びLC-MSを用いた分析法だけではなお感度が不足していた。そこで、高比活性³H標識体投与の血漿中代謝物を放射能検出器のついたHPLCによりモニターしながら、GC-MS及びLC-MSにより構造解析を行った。この高比活性³H標識体とMSとの併用法は、血漿中微量代謝物の同定法として極めて有効であった。これにより、ビタミンD類として新規代謝物である17-水酸化体[1 α ,17,20 S (OH)₃hexanorD₃]を含む7種類の代謝物を合成標品との比較を行いながら同定することに成功した (Fig. 1)。

2. LC-MS-MSによるOCTの微量定量法の開発 (第2章)

従来、ビタミンDの微量定量は主にバイオアッセイにより行われ、OCTの臨床検体についてはRIAを用いて行われてきた。しかしながら、RIAではHPLCによる分取を含めた煩雑な前処理が要求され測定に時間がかかるうえに感度が不足していた。したがって、OCTの正確な動態把握のためには、感度、特異性及び測定時間の面でRIAに勝る測定系の開発が切望されていた。著者は、MSを用いたヒト血清中OCTの定量法の開発をヒト標準血清を用いて行った。第1章で測定したOCTのGC-EI/MS及びLC-APCI/MSのスキャンスペクトルの結果から、EIやAPCIによるイオン化では分子イオンあるいは分子量関連イオンが相対的に低くフラグメントイオンが多く検出されたため、高感度定量法を確立する目的には不利と判断し、更にソフトなイオン化であるelectrospray ionization (ESI)をイオン化法として選択した。また、特異性と感度を上げる観点からselected reaction monitoring (SRM) を測定モードとして導入したが、多くの測定妨害物質を含む血清試料中のOCTを分離定量するのに有効であった。すなわち、複雑なマトリックス中から簡便な前処理だけでOCTを選択的に高感度測定することが可能であった。本研究で確立したOCTの微量定量法における定量下限は30 pg/mLであり、これはヒトにOCT (6.6 µg/body) 静脈内投与後4~8時間の血清中濃度に相当する。本法は従来のRIAに比べ、感度及び精度とも改善され、測定時間も大幅に短縮された。これらの点から臨床におけるOCTの薬物動態の正確かつ迅速な解析に有用であると考えられる。本法は、臨床でのRIAに代わる定量法として現在使用されている。

3. Q-ToF MSを用いたグルタチオン抱合化反応の解析 (第3章)

薬物の代謝経路解明と並んで薬物代謝研究のもうひとつの重要な柱である薬物代謝酵素の分析に対してMSが応用できるか否かについて検討した。従来、薬物とその代謝に関与する酵素との連続的な反応を解析する場合には、主に酵素反応速度論を用いて考察し、その代謝反応機構を推察してきた。この方法では酵素と基質あるいは反応生成物との相互作用を直接分析することはできないため、中間体の生成等を含めた反応機構の解明は困難であった。また、分析に多大な時間を費やすため多検体の評価には適さなかった。著者は、薬物代謝酵素の分析におけるMSの効果的な応用法を開発するため、次のようなMS条件の組み合わせが最適と考えた。すなわち、タンパク質のMS解析に有効なイオン化法としてnanospray-ESIを選択し、質量分離系として新規に開発された四重極と飛行時間型の異なる2種類の質量分離系を組み合わせたQ-ToF MSを選択した。Q-ToF MSの特徴が、従来の四重極型MS装置より高感度、高分解能で高質量範囲測定が可能であることに着目し、非共有結合複合体を含めたタンパク質試料の分析に有効な方法と考えた。

このESIとQ-Tofの組み合わせにより生理的濃度 (5 μM) レベルにおけるGTの未変性状態での分析及び酵素とリガンド間の非共有結合体の直接分析を行った。その結果、有機溶媒を含まない中性の緩衝液、40℃前後のイオン源温度、ナノプローブをインターフェースに用いることによりGTの活性型であるGTホモダイマー (2GT) や2GT/GSHとの非共有結合体 (A~C, Fig. 2) 等のイオンを生理的濃度レベルで明確なイオンとして分析することに成功した。Q-Tof MSにより得られたGTの分析結果は、すでに報告されたX線スペクトル解析結果とよく一致し、生理的条件下でのGTの状態をよく反映していることを示していた。次に、確立した分析条件を用いてGT溶液に基質

(1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB) を添加して経時的な分析を行った結果、基質非添加時には認められなかった酵素とリガンド間の数種の非共有結合体 (D~I, Fig. 2) が認められ、これらの中には反応生成物であるGSH抱合体とGTとの非共有結合体が多く含まれていた。検出された非共有結合体は、時間経過とともにそのイオン強度が変化し、これらのイオンの挙動変化はGSH抱合体の反応過程を解釈する上で有用であった (Fig. 2)。Q-Tof MSは、高質量領域だけでなく低質量領域も同時に測定できるため、酵素・生成物複合体の直接分析に加え低質量側に検出される生成物の同時分析も可能であった。X線結晶構造解析やNMRと比較した時のQ-Tof MSの最大の利点は、酵素反応の反応過程で生じる酵素とリガンド間の非共有結合体の動的変化を微量でしかも短時間で分析可能なことであり、酵素反応の機構解明だけでなく酵素を介した

薬効や毒性機構の解明等に有用である。もう一つの利点は、結晶化の問題やタンパク質の分子量に関係しないためタンパク質の種類に制限なく測定できることである。本法は、薬物代謝酵素反応の新しい解析手法であり、創薬において候補検体の代謝に関与する酵素と薬効・毒性間の関係を短期間に把握するための方法として期待できる。

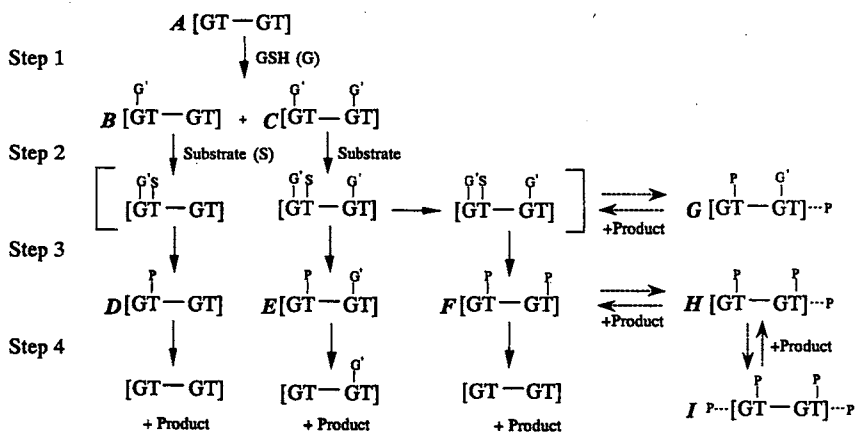


Fig.2. Possible reaction pathway of the GSH conjugation of CDNB by GT

4. 結論及び考察

MSは薬物動態研究の基盤技術のひとつであり、MSと薬物動態研究はほぼ並行して進展してきた。しかしながら、薬物代謝研究へのMSの応用は、最近の生化学領域で行われている高分子研究へのそれに比べ、未開拓の部分も多い。本論文では、最近の薬物開発の課題である微量投与量薬物の代謝研究へ対応するために、構造解析及び定量面でのMSの実践的な応用法を述べた。さらに、最近開発された質量分析装置Q-Tof MSを用いて、酵素・リガンドの非共有結合体を分析できる条件を見出し、本法が薬物代謝酵素 (GT) の反応解析に有用な分析法であることを示した。すなわち、1) 異なる特徴をもつ従来型MSの長所の組み合わせによる構造解析手法、2) LC-MS-MSのビタミンD微量定量法への応用、3) Q-Tof MSの薬物代謝酵素研究への応用を具体的に示した。MSの進歩は日進月歩であり、今後も、本論文で確立した方法も含め、MSの技術革新とともに薬物代謝研究への新しい応用法が確立されることを期待したい。

学位論文審査結果の要旨

本論文は薬物代謝研究へのMSの活用を行ったもので以下のような内容である。

最近の新薬開発では強力な薬理活性を有する薬物を扱うことが多く、ますます低用量化の傾向となり、血中濃度や代謝物解析等の動態・代謝項目を正確に評価することが困難となった。一方、MSのイオン化法及び質量分離系は多様化しており、各動態・代謝実験項目に対してどの組み合わせが最も効果的かを見極めることや、有効な応用法を開発していくことが必須となった。

そこで、第1章では、MSを用いた低用量薬物の代謝物分析例として、ビタミンD誘導体、22-oxacalcitriol (OCT) をラットに静脈内投与後2時間の血漿中代謝物の同定を行った。高比活性³H標識OCT投与後の血漿中代謝物を放射能検出器付HPLCでモニターしながら、非標識体投与後の血漿代謝物をGC-MS及びLC-MSにより分析する方法により、7種類の代謝物を合成標品との比較により同定することに成功した。これらのなかで、17-水酸化体はビタミンDの代謝物として初めての例であった。

第2章では、LC-MS-MSを用いたOCTのヒト血清中における微量定量法の開発を行った。ここでは、感度及び精度を上げるため第一四重極での親イオンの開裂がAPCIより少ないESIをイオン源として、LC-MS-MSを測定モードとして用いた。その結果、本法は、多くの測定妨害物質を含む血清試料中のOCTを分離定量するのに極めて有効であった。すなわち、従来法であるRIAではOCTを精製するための煩雑な前処理操作が要求されたのに対し、LC-MS-MSでは簡便な前処理だけで選択的に高感度測定することが可能であった。本法は、臨床でのRIAに代わる定量法として現在使用されている。

次に第3章では、薬物代謝酵素反応の動的解析へMS応用した。モデル薬物代謝酵素として、諸性質が明かにされているヒトグルタチオン-S-トランスフェラーゼ α 1-1 (GT)を用い、生理的条件下における酵素とそのリガンド(基質、生成物等)の非共有結合体の直接分析を最近開発されたQ-ToFMSを用いて行った。その結果、有機溶媒を含まない中性の緩衝液、40℃前後のイオン源温度、ナノプローブをインターフェースに用いることによりGTの活性型であるGTダイマー(2GT)や2GT/グルタチオンとの非共有結合体等のイオンを生理的濃度レベルで明確なイオンとして分析することに成功した。さらに、GTの基質を添加して経時的な分析を行った際、基質非添加時には認められなかった酵素とリガンド間の数種の非共有結合体が認められ、これらは、本抱合化反応の各過程に現れる中間体と考えられた。

上記につき5名の審査員による個別面接及び8月1日の口頭発表試験を行い、博士(薬学)に相当するものと認める。