

Title	薬局・居宅におけるDBS法を用いたPK/PD/PGxに基づく至適個別化療法の確立
Sub Title	The development of optimal individualized therapy based on PK/PD/PGx using the DBS method in community pharmacies and at home
Author	横山, 雄太(Yokoyama, Yūta)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>簡便かつ低侵襲な微量採血によるdried blood spot ( DBS ) 法の活用がTDMおよび遺伝子多型解析の実施において推奨されている。本研究では微量血液を用いるDBS法による薬物濃度測定法および遺伝子多型解析を確立し、DBSカードのK+濃度および赤血球 / 血漿移行定数を用いる事によるDBS法の全血中濃度から血漿中濃度への換算法の妥当性を明らかとした。今回明らかにしたDBSの全血中濃度から血漿中濃度への換算法の確立は、今後、DBS法を用いたPK/PD/PGxに基づいた有効性および安全性を考慮した個別最適化投与法の構築に繋がる事で薬局・居宅におけるTDM実施に向けても期待できる。</p> <p>The dried blood spot (DBS) method is recommended for therapeutic drug monitoring (TDM) and genetic polymorphism analyses because the microsampling approach involved is simple and minimally invasive. In the present study, we established a method for measuring drug concentrations and analyzing genetic polymorphisms in a small amount of whole blood using DBS sampling. We also demonstrated the validity of the method to convert whole blood concentrations to plasma concentrations in the DBS method using K+ concentrations on the DBS card and the RBC/plasma rate. The establishment of the method to convert whole blood concentrations to plasma concentrations in DBS will contribute to the development of an individual optimized dosage regimen that considers efficacy and safety based on PK/PD/PGx using DBS, which will facilitate TDM in community pharmacies and at home.</p>
Notes	<p>研究種目：若手研究 研究期間：2018～2020 課題番号：18K14990 研究分野：医療薬学</p>
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K14990seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K14990seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14990

研究課題名（和文）薬局・居宅におけるDBS法を用いたPK/PD/PGxに基づく至適個別化療法の確立

研究課題名（英文）The development of optimal individualized therapy based on PK/PD/PGx using the DBS method in community pharmacies and at home

研究代表者

横山 雄太（Yokoyama, Yuta）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・助教

研究者番号：70725796

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：簡便かつ低侵襲な微量採血によるdried blood spot（DBS）法の活用がTDMおよび遺伝子多型解析の実施において推奨されている。本研究では微量血液を用いるDBS法による薬物濃度測定法および遺伝子多型解析を確立し、DBSカードのK<sup>+</sup>濃度および赤血球/血漿移行定数を用いる事によるDBS法の全血中濃度から血漿中濃度への換算法の妥当性を明らかとした。今回明らかにしたDBSの全血中濃度から血漿中濃度への換算法の確立は、今後、DBS法を用いたPK/PD/PGxに基づいた有効性および安全性を考慮した個別最適化投与法の構築に繋がる事で薬局・居宅におけるTDM実施に向けても期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

簡便かつ低侵襲な微量採血によるdried blood spot（DBS）カードの活用が血中濃度のモニタリングおよび遺伝子多型解析の実施において推奨されている。本研究により微量血液を用いるDBS法による薬物濃度の測定および遺伝子多型の解析を確立し、DBSカードの薬物濃度から治療に関する薬物濃度への換算法の妥当性を明らかとした。今後、DBSカードを用いて有効性および安全性を考慮した最適な投与方法の構築に繋がる事で薬局・居宅における血中濃度のモニタリングに向けても期待できる。

研究成果の概要（英文）：The dried blood spot (DBS) method is recommended for therapeutic drug monitoring (TDM) and genetic polymorphism analyses because the microsampling approach involved is simple and minimally invasive. In the present study, we established a method for measuring drug concentrations and analyzing genetic polymorphisms in a small amount of whole blood using DBS sampling. We also demonstrated the validity of the method to convert whole blood concentrations to plasma concentrations in the DBS method using K<sup>+</sup> concentrations on the DBS card and the RBC/plasma rate. The establishment of the method to convert whole blood concentrations to plasma concentrations in DBS will contribute to the development of an individual optimized dosage regimen that considers efficacy and safety based on PK/PD/PGx using DBS, which will facilitate TDM in community pharmacies and at home.

研究分野：医療薬学

キーワード：TDM hemaPEN 赤血球/血漿移行定数 DBS PK/PD/PGx 微量血液 遺伝子多型解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

簡便かつ低侵襲な微量採血による dried blood spot (DBS) 法の活用が therapeutic drug monitoring (TDM) および遺伝子多型解析の実施において推奨されている。DBS 法は在宅および外来患者において、有用な方法と考えられ、従来の採血法と DBS 法との比較検討により、臨床での TDM 実施に繋がる事が期待されている。DBS 法の利点として、必要血液量が微量であること、血漿分離操作が不要であること、乾燥後は室温での保存が可能であること等が挙げられ、DBS 法は在宅および外来患者における最適な治療に向けて有用な方法と考えられ、DBS 法を用いた TDM 対象薬の臨床薬物動態 (pharmacokinetics:PK) /薬力学 (pharmacodynamics:PD) /ゲノム薬理 (pharmacogenomics:PGx) 関係を明確化する検討により、薬局・居宅において TDM 実施可能性も期待できる。

### 2. 研究の目的

微量血液を用いた DBS 法による TDM 実施および遺伝子多型解析により薬局の臨床患者における PK/PD/PGx に基づいた有効性および安全性を考慮した最適な薬物療法に向けて、TDM 対象薬および薬物動態関連遺伝子を対象にし、ラットモデルおよびヒト血液検体を用いた DBS 法による全血中薬物濃度からの血漿中薬物濃度への換算法および遺伝子多型解析の確立を目的とし、PK/PD/PGx アプローチに関連する検討を実施した。

### 3. 研究の方法

(1) DBS 法を用いたラット血液によるテオフィリンおよびピルシカイニドの全血中および血漿中濃度測定法の構築

全血 20  $\mu$ L を DBS カード Whatman<sup>®</sup> に滴下、乾燥後、打ち抜いたディスクをメタノールにより薬物を溶出、血漿 100  $\mu$ L はアセトニトリルによる除タンパク法から薬物を抽出し、LC-MS/MS により全血中および血漿中濃度を測定した。LC-MS/MS は 3200 QTRAP LC-MS/MS (AB SCIEX 社)、カラムは Imtakt Unison UK-C18 50 $\times$ 3 mm、3 $\mu$ m を使用した。移動相は【A】0.1%ギ酸/水、【B】0.1%ギ酸/アセトニトリルを用い、流速は 0.2 mL/min であった。

(2) ラットモデルを用いた DBS 法による全血中濃度から血漿中濃度への換算について

Wistar/ST 系雄ラット (10 週齢) にテオフィリンおよびピルシカイニドを経口投与し、経時的に採血をした。濃度調製された血漿検体を測定した血漿中濃度を用いて、赤血球/血漿移行定数を算出した。DBS カードから精製水で抽出した  $K^+$ 濃度を測定し、 $K^+$ 濃度と Ht 値の相関図から、Ht 値を予測した。予測 Ht 値および赤血球/血漿移行定数を用いた予測式の血漿中濃度 = 全血中濃度 / {1 - ヘマトクリット (Ht) 値  $\times$  (1 - 赤血球/血漿移行定数)} により、全血中濃度から換算血漿中濃度を算出した。本研究は慶應義塾動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号:18021- (0))。

(3) hemaPEN を用いたヒト血液によるテオフィリンおよびラモトリギンの全血中および血漿中濃度測定法の構築

購入した正常ヒト全血液 (A 型) を用いて、テオフィリンおよびラモトリギンを添加した全血サンプルを調製し、定容積サンプリングデバイスとして開発された hemaPEN を用いて DBS カードに全血 2.74  $\mu$ L の 4 スポットを滴下した。DBS カードをメタノールにより薬物を溶出、血漿 10  $\mu$ L はメタノールによる除タンパク法から薬物を抽出し、LC-MS/MS により全血中および血漿中濃度を測定した。テオフィリンにおいて、LC-MS/MS は 3200 QTRAP LC-MS/MS (AB SCIEX 社)、カラムは Imtakt Unison UK-C18 50 $\times$ 3 mm、3 $\mu$ m を使用した。移動相は【A】0.1%ギ酸/水:【B】0.1%ギ酸/メタノール = 80:20 を用い、流速は 0.2 mL/min であった。ラモトリギンにおいて、LC-MS/MS は LCMS-8050 (島津製作所社) カラムは Imtakt Unison UK-C18 50 $\times$ 2 mm、3 $\mu$ m を使用した。移動相は【A】10mM ギ酸アンモニウム / 0.15%ギ酸/水:【B】メタノールを用い、流速は 0.2 mL/min であった。DBS カードおよび調製した血漿サンプルそれぞれからテオフィリンおよびラモトリギンを抽出し、LC-MS/MS を用いて全血中および血漿中濃度を測定した。

(4) hemaPEN を用いたヒト血液による遺伝子多型解析

正常ヒト全血液を用いて、hemaPEN から得られた DBS カード 1 枚を用いて、QIAamp DNA Mini Kit の乾燥血液からの DNA 精製の手順に従い、DNA 抽出を行った。ラモトリギンの薬物濃度推移に關与する UGT2B7 の UGT2B7 -161C>T を遺伝子多型解析項目とし、リアルタイム PCR により遺伝子多型を決定した。

(5) ヒト血液を用いた hemaPEN による DBS 法でのテオフィリンの全血中濃度から血漿中濃度への換算について

正常ヒト全血液を用いて、42 種類の Ht 値、濃度の異なる全血サンプルを調製後、測定した血

漿中濃度を用いて、赤血球 / 血漿移行定数を算出した。正常ヒト全血液の血漿量を調製し、異なる Ht 値の全血を滴下した DBS カードから精製水で抽出した K<sup>+</sup>濃度を測定し、K<sup>+</sup>濃度と Ht 値の相関図から、Ht 値を予測した。模擬臨床サンプルとして 18 種類の Ht 値、薬物濃度の異なる全血液サンプルを調製し、DBS サンプルから得られた全血中濃度、予測 Ht 値および赤血球 / 血漿移行定数を用いた予測式の血漿中濃度 = 全血中濃度 / {1 - ヘマトクリット (Ht) 値 × (1 - 赤血球 / 血漿移行定数)} により、全血中濃度から換算血漿中濃度を算出した。

#### 4. 研究成果

(1) ラット血液による DBS 法および血漿を用いたテオフィリンおよびピルシカイニドの全血中および血漿中濃度測定法の構築

各薬物において血漿および DBS での各検量線 (n = 3) は 25-2,000 ng/mL の範囲で良好な直線性 (r<sup>2</sup> 0.999) が得られ、日内変動 (n = 5) および日差変動 (n = 3) は定量下限での精度が 20%以内、真度が ±20%以内であり、低濃度、中濃度、高濃度では精度が 15%以内、真度が ±15%以内であり、全て基準範囲内であった。また、血漿および DBS の回収率はテオフィリンが 87.8%、57.3%、ピルシカイニドが 103%、83.2%であった。DBS サンプルでは、ピルシカイニドより蛋白結合率が高い薬物であるテオフィリンほど、DBS カードから抽出されにくく、回収率が低くなったと考えられた。

(2) ラットモデルを用いた DBS 法による全血中濃度から血漿中濃度への換算について

DBS の K<sup>+</sup>濃度と Ht 値の相関係数は r = 0.917 (p < 0.01) であり、K<sup>+</sup>濃度と Ht 値との間には強い相関関係が示された。赤血球 / 血漿移行定数はテオフィリンが 0.44、ピルシカイニドが 1.04 であり、この値と予測 Ht 値を用いて濃度換算を行った結果、テオフィリン (n = 6) およびピルシカイニド (n = 5) においては、血漿中濃度と全血中濃度から算出された換算血漿中濃度およびそれぞれの濃度推移 (図 1) による AUC<sub>0-</sub> は同等な結果となった。Bland-Altman plots により、テオフィリンは 3 点、ピルシカイニドは 1 点を除き、平均 ±1.96SD 範囲内の誤差であった。これらの結果より、DBS 法の全血中濃度から血漿中濃度への換算法の妥当性が明らかとなった。

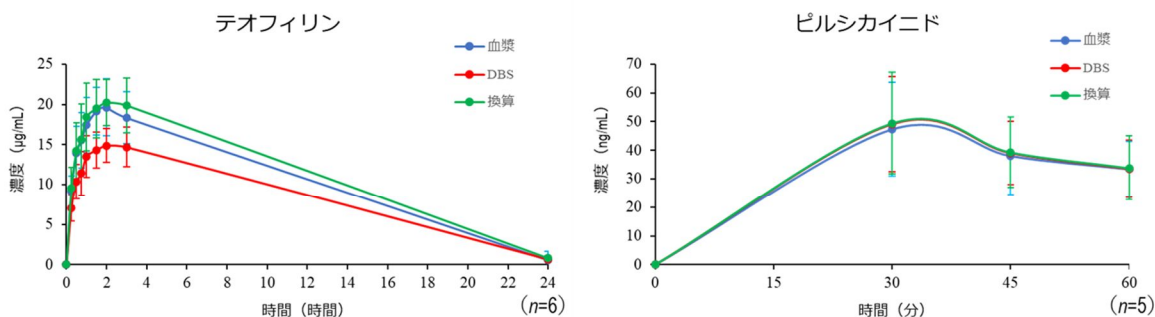


図1 K<sup>+</sup>濃度からの予測Ht値を用いた各薬物における換算濃度の経時推移

(3) ヒト血液による hemaPEN による DBS 法および血漿を用いたテオフィリンおよびラモトリギンの全血中および血漿中濃度測定法の構築

テオフィリンにおいて血漿 (n = 3) および DBS (n = 4) での各検量線は 0.5-40 ng/mL の範囲で良好な直線性 (r<sup>2</sup> 0.999) が得られ、日内変動 (n = 5) および日差変動 (n = 3) は定量下限での精度が 20%以内、真度が ±20%以内であり、低濃度、中濃度、高濃度では精度が 15%以内、真度が ±15%以内であり、全て基準範囲内であった。また、血漿および DBS の回収率は 109.5%、78.2%であった。hemaPEN のデバイスによるサンプリングにおける回収率は平均 93%であった。

ラモトリギンにおいて血漿 (n = 3) および DBS (n = 4) での各検量線は 0.1-20 ng/mL の範囲で良好な直線性 (r<sup>2</sup> 0.996) が得られ、日内変動 (n = 5) および日差変動 (n = 3) は定量下限での精度が 20%以内、真度が ±20%以内であり、低濃度、中濃度、高濃度では精度が 15%以内、真度が ±15%以内であり、全て基準範囲内であった。また、血漿および DBS の回収率は 89.0%、95.4%であった。

(4) hemaPEN を用いたヒト血液による遺伝子多型解析

hemaPEN から得られた DBS カード 1 枚より、DNA を抽出後、リアルタイム PCR により UGT2B7-161CC の結果が得られ、hemaPEN の DBS 法を用いて、遺伝子多型解析が可能である事が明らかになった。

(5) ヒト血液を用いた hemaPEN による DBS 法でのテオフィリンの全血中濃度から血漿中濃度への換算について

hemaPEN による DBS の K<sup>+</sup>濃度および血液 Ht 値の相関係数は r = 0.952 (p < 0.01) であり、K<sup>+</sup>濃度と Ht 値との間には強い相関関係が示された。赤血球 / 血漿移行定数はテオフィリンの全血中濃度および Ht 値の増加に伴い、K 値も増加傾向となり、K 値を薬物固有の定数ではなく、Ht

値および全血中濃度に依存する薬物固有変数として血漿中濃度の換算に用いる必要性が確認された(図2)。図2で得られた各テオフィリン濃度におけるHt値より該当する換算式から導いた赤血球/血漿移行定数を換算式に代入して全血中濃度から換算された換算血漿濃度と測定した血漿濃度の比較結果を図3に示す。測定血漿濃度と換算血漿濃度の間には強い相関( $r = 0.987$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 33$ )が得られ、Bland-Altman plotsにより、3点を除いた全てのサンプルにおいて平均 $\pm 1.96SD$ 範囲内の誤差であった。これらの結果より、ヒトにおいて推移するテオフィリンの濃度範囲にて良好な換算結果が得られたため、hemaPENによる全血中濃度からの血漿換算式は臨床において応用可能であると考えられる。

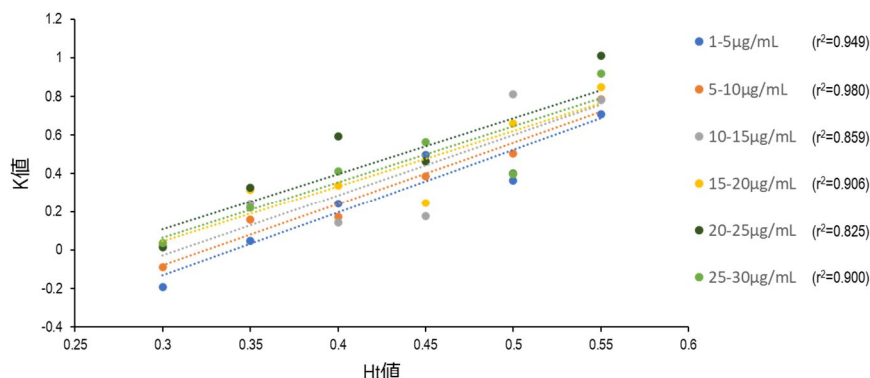


図2 赤血球/血漿移行定数における各濃度域ごとのHt値とK値の関係性

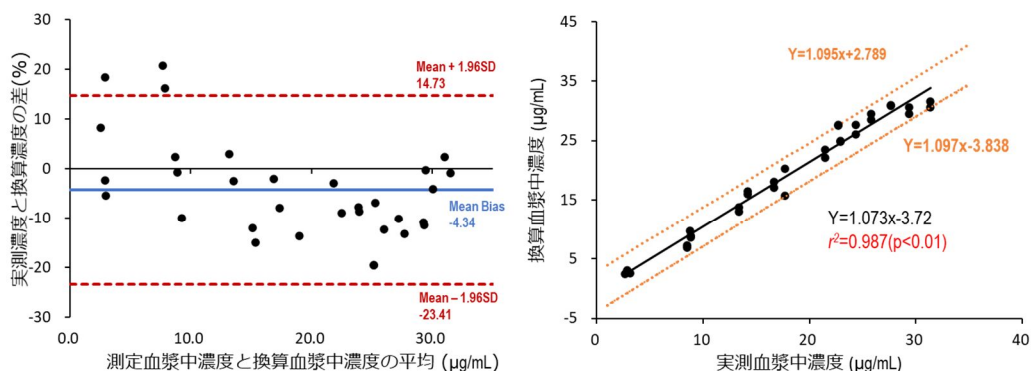


図3 血漿中濃度の実測値と換算血漿中濃度の比較

以上の結果より、微量採血のDBS法による薬物濃度測定法および遺伝子多型解析を確立した。DBSカードのK<sup>+</sup>濃度および赤血球/血漿移行定数を用いる事によるDBS法の全血中濃度から血漿中濃度への換算法の妥当性を明らかとした。今回明らかにしたDBS法を用いた全血中濃度から血漿中濃度への換算法の確立は、PK/PD/Pgxに基づいた有効性および安全性を考慮した個別最適化投与法の構築に繋がる事で今後の薬局・居宅におけるTDM実施も期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩下昌敬、横山雄太、平賀ゆい、地引綾、河添仁、鈴木小夜、中村智徳
2. 発表標題 薬局および在宅での微量血液によるdried blood spot (DBS) 法を用いたTDM実施に向けて～ヒト血液検体を用いたDBSカード全血中濃度の血漿中濃度への換算法の確立～
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横山雄太、横尾英明、雑賀海人、平賀ゆい、地引綾、河添仁、鈴木小夜、中村智徳
2. 発表標題 薬局および在宅での微量血液によるdried blood spot (DBS) 法を用いたTDM実施に向けて～ラットモデルを用いたDBSカード全血中濃度の血漿中濃度への換算法の確立～
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横山 雄太
2. 発表標題 臨床薬剤師と薬学部との連携：エビデンスの創出および薬剤師の臨床研究能力の向上
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------