九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

医薬品ー微生物間相互作用の解明を目的とした医薬品一斉分析系の構築と実践

土谷, 祐一

https://hdl.handle.net/2324/7157318

出版情報：Kyushu University, 2023, 博士（臨床薬学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

医薬品―微生物間相互作用の解明を目的とした
医薬品一斉分析系の構築と実践

2023 年

九州大学大学院薬学府

臨床薬学専攻　臨床薬物治療学分野

土谷　祐一

目次

緒言 1

論文目録 3

第一章 液体クロマトグラフィータンデム質量法（LC-MS/MS）を用いた医薬品の一斉分析系の構築 4

第一節 序論 4

第二節 方法 9

第一項 経口分子標的薬 9

試薬 9

LC-MS/MS の分析条件 11

標準溶液、検量線標準用試料および品質管理試料の調製 13

ヒト血漿での測定 13

構築した分析法のバリデーション 14

第二項 免疫抑制薬 15

試薬 15

LC-MS/MS の分析条件 17

ストック溶液の調製 17

ヒト全血での測定 18

分析バリデーションの評価項目 19

第三節 結果 20

選択性 20

検量線 25

日内変動と日間変動 27

回収率・マトリックスファクター 31

安定性 37
第四節 考察 41
第五節 小括 44
第二章 医薬品－微生物間相互作用の *in vitro* スクリーニングと消失機構の解明 45
第一節 序論 45
第二節 方法 48
試薬 48
解析対象微生物の選定 48
微生物の単離と培養条件 49
薬液の調整 50
培養培地のサンプリング 50
培養液と菌体成分の画分の調整 52
画分別培養培地のサンプリング 52
培養培地での経口分子標的薬の測定 53
培養培地での免疫抑制薬測定 54
標品を用いたタクロリムス代謝産物の定性 54
スキャンモードを用いた代謝物の探索 56
統計処理 57
第三節 結果 58
細菌培養が薬物残存に及ぼす影響についての *in vitro* スクリーニング 58
Bacillus subtilis が免疫抑制薬の残存に及ぼす影響 62
菌体の画分を用いた薬物消失機構の解明 64
ヒトにおけるタクロリムスの主要代謝産物の標品を用いた代謝産物の推定

.....66
スキャンモードによる代謝産物の網羅的探索 69
第四節 考察 76
第五節 小括 80
総括 81
参考文献 85
謝辞 94

略語一覧

anaplastic lymphoma kinase inhibitor	ALKI
brain heart infusion	BHI
calcineurin inhibitor	CNI
chronic myeloid leukemia	CML
cell exit potential	CXP
coefficient of variation percent	C.V.%
collision energy	CE
collision voltage	CV
control	CNTL
declustering potential	DP
dimethyl sulfoxide	DMSO
electrospray ionization	ESI
epidermal growth factor receptor	EGFR
ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA
fluorescence spectrometry	FL
food and drug administration	FDA
high quality control	HQC
insoluble or cell debris fraction	Deb
liquid chromatography	LC
lower limit of quantification	LLOQ

low quality control	LQC
mammalian target of rapamycin	mTOR
mass spectrometry	MS
middle quality control	MQC
multiple reaction monitoring	MRM
non-small cell lung cancer	NSCLC
polytetrafluoroethylene	PTFE
polyvinylidene fluoride	PVDF
quality control	QC
soluble cell lysate fraction	CL
supernatant fraction	Sup
therapeutic drug monitoring	TDM
tyrosine kinase inhibitor	TKI
ultraviolet visible absorption spectrometry	UV/Vis
whole cell lysate	WCL

緒言

医薬品の吸収、分布、代謝、排泄といった体内動態には個人差があり、その効果や副作用発現に大きく影響することが知られている。この個人差には薬物代謝酵素や薬物トランスポーターなど薬物動態関連遺伝子が関連するとして、これまでに多くの研究が行われており[1–4]、薬物治療の最適化に応用されている[5]。

近年、腸内細菌がヒトの健康に様々な影響を与えていることが明らかになりつつあり、その一つとして医薬品の効果・副作用発現への影響が挙げられる[6,7]。これまでにも腸内細菌叢の個人差や、抗菌薬の使用による腸内細菌叢の変動が医薬品の体内動態に影響を及ぼすという報告が散見されており[8,9]、今後メタゲノム、メタボローム解析技術の進歩に伴ってマイクロバイオーム研究が発展し、解析が進むことが期待される。一方で、整腸剤や発酵食品に含まれる細菌が医薬品の体内動態に及ぼす影響についての報告はほとんどないのが現状である。整腸剤や発酵食品に含まれる酪酸菌の産生する酪酸のように、細菌により産生される種々の短鎖脂肪酸は免疫応答の改善を促すことが示されている[10–13]。その一方で、有害事象に関する報告は少なく有用性が高いとして、整腸剤や発酵食品は医療現場だけでなく日常生活においても広く利用されている[14,15]。

健康の保持増進を目的とした整腸剤や発酵食品の使用頻度の増加はその有益性のみが評価されがちであるが、整腸剤や発酵食品の日常的な摂取にマイナスの側面がないとは言い切れない。その一つの可能性として整腸剤や発酵食品に含まれる微生物による医薬品の代謝が挙げられる。ヒト腸内細菌叢由来の細菌を用いて医薬品の代謝活性を網羅的に調査した結果、対象とした医薬品の約2/3がいずれかの細菌によって代謝されるという報告[16]があることから、整腸剤や発酵食品由来の細菌も医薬品に対する代謝能を有している可能性は十分に考えられる。これまでに報告された腸内細菌による医薬品代謝への影響に関

する研究のほとんどが糞便中の細菌を用いる *ex vivo* 系で行われている[17]が、実際に医薬品が吸収される小腸上部とは構成細菌の種類や割合、菌数も大きく異なっており[18]、生体内での反応を正確に反映していない可能性がある。

外部から摂取した細菌が生体内で医薬品に対して代謝活性を示すかどうかについては明らかでないが、多くの整腸剤や発酵食品には糞便と同程度の菌数である数億を超える細菌が含まれている上、その一部は回腸付近でも生残するという報告[19]もある。このことから経口摂取した細菌の一部は生きたまま腸管に到達し、医薬品の生物学的利用性に対して一定の影響を示すものと推測される。

以上の背景から、本研究では医薬品と整腸剤や発酵食品由来の経口摂取可能な微生物間の相互作用を切り口とした体内動態の個人差解明に関する研究を行い、医薬品の効果を減弱させることなく効果的な整腸剤や発酵食品の摂取方法を構築することを目指して、整腸剤・発酵食品由来の細菌による医薬品の代謝活性の評価を行った。医薬品は、外部から摂取した細菌との接触がある経口内服薬のうち、血中濃度の変化が治療効果に大きく影響するものを対象とした。

薬物濃度の測定値を適切に評価するためには、測定値に対する高い信頼性が求められている。近年では、生体試料中における薬物濃度分析のバリデーションに関するガイドラインが米国食品医薬品局[20]および厚生労働省医薬食品局[21]よりそれぞれ発出され、より一層バリデーションの重要性が高まっている。今回代謝活性の評価を行うにあたり構築した測定系は生体試料を用いることを想定していることから、これらのガイドラインに準拠する必要がある。

そこで、第一章では液体クロマトグラフィータンデム質量法を用いて経口分子標的薬ならびに免疫抑制薬の薬物血中濃度一斉分析系の構築とそのバリデーションを行った。第二章では、第一章で構築した分析系を用いて、発酵食品・整腸剤中の微生物による医薬品の代謝活性の評価を *in vitro* で行った。

論文目録

Simultaneous determination of plasma concentration of 12 oral molecular-targeted drugs by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

TSUCHIYA Yuichi, SUETSUGU Kimitaka, YAMAMOTO Nanae, KOBAYASHI Daisuke, TSUJI Toshikazu, WATANABE Hiroyuki, EGASHIRA Nobuaki, MASUDA Satohiro.

Jap J Ther Drug Monit, 36 (3): 105-116 (2019)

第一章 液体クロマトグラフィータンデム質量法（LC-MS/MS）を用いた医薬品の一斉分析系の構築

第一節 序論

上皮成長因子受容体-チロシンキナーゼ阻害薬（EGFR-TKI）に分類されるゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブおよび未分化リンパ腫キナーゼ阻害薬（ALKI）であるクリゾチニブ、アレクチニブなどの経口分子標的薬の登場は、該当遺伝子変異が陽性の進行性非小細胞肺がん（NSCLC）治療に革新的な変化をもたらした[22–27]。同様に 2001 年に世界で初めて経口分子標的薬として承認されたイマチニブは、予後不良な疾患の一つとして知られている慢性骨髄性白血病（CML）の治療に大きな変化をもたらし[28,29]、第二世代となるダサチニブ、ニロチニブ、ボスチニブの開発[30–32]により、今日では 7 年生存率 90% 以上の長期生存を可能としている[33]。このように経口分子標的薬の開発は、抗悪性腫瘍治療戦略の変革及び生存期間の延長に大きく寄与しており、今なお発展途上の段階にある。

しかしながら、爆発的な勢いで経口分子標的薬の使用が進んでいく中で新たな問題点も明らかになってきた。経口分子標的薬は殺細胞性の抗がん薬と異なり、体表面に関わらず固定用量で開始されるため、体格によって用量不足や過量投与による有害反応を生じる危険性がある[34]。さらに用量不足を起因として、がん細胞が薬物耐性を獲得することも報告[35]されており、治療効果への影響も懸念されている。また、経口分子標的薬の多くは肝代謝型の薬物である。薬物代謝酵素や薬物トランスポーターを介した併用薬との相互作用の影響はさることながら、最近では薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの遺伝子多型と分

子標的薬による副作用発現の関連に関する報告[36]がなされ、体内動態の個人差が大きい点は臨床上ますます看過できない問題となっている[35,37–40]。

したがって、経口分子標的薬治療における効果と安全性を最大限に引き出すにあたって薬物血中濃度のモニタリングは必要不可欠である。しかしながら、臨床において診療報酬の対象となった経口分子標的薬はイマチニブおよびスニチニブの 2 薬物のみであり[41–46]、他の経口分子標的薬については臨床薬理学的な検討が未だ不足しており、治療域・中毒域を決定する情報も少ない[47–55]。そのため現在診療報酬の対象外である他の経口分子標的薬を対象とした測定系の構築は今度の臨床応用に向けて基盤となると考えられる。

カルシニューリン阻害剤（CNI）であるタクロリムスは臓器移植後の拒絶反応抑制目的で使用される主要な免疫抑制剤であるが、血中濃度が治療域を上回る患者においては急性腎毒性の副作用を引き起こす原因にもなっている[56,57]。さらに治療域が狭いことが知られており、免疫抑制薬は血中濃度管理を含めた治療薬物モニタリングが重要性であることが示されている[58–60]。CNI の開発により移植成績は大きく向上したが、主として移植片の短期的な生着率の向上であり、5 年以上の長期的な生着率には改善が見られていない[61]。これは CNI の慢性的な使用により生じる腎線維化を特徴とする不可逆的な腎毒性が原因で薬剤の使用が困難となることに起因している[62]。そのため現在では CNI 関連腎障害軽減を目的とした様々な薬物併用プロトコールが検討されている[63–67]。なかでも哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（mTOR）阻害を介して免疫抑制作用を有するエベロリムスは抗線維化作用をもつことから CNI 関連腎障害に対する腎保護作用が期待されており[68,69]、タクロリムスの併用薬として今後ますます使用頻度が高まることが予想される。しかしながら、薬物の併用は個々の副作用発現を低下させつつ治療効果を高める一方で、薬物同士の様々な相互作用

を誘発させる可能性がある。その一例として、先の経口分子標的薬同様、薬物代謝酵素を介した相互作用が挙げられる。

タクロリムスの代謝酵素である薬物代謝酵素シトクロム P450 の分子種 CYP3A には、遺伝子多型および発現量の差があることが知られており、薬物の代謝能に 30 倍の個人差があると言われている [70]。さらには他の免疫抑制薬、ステロイドおよびアゾール系真菌薬の併用により、薬物代謝酵素を介して体内動態の個人差を更に拡大させる [65,71–78]。そのため、複数の薬剤を同時に服用している環境下において、治療薬物モニタリング（TDM）を行いながら免疫抑制薬の用量調節を行うことが必要不可欠であるといえる。

臨床において用いられる薬物血中濃度の主な測定法は、免疫学的測定法と分離分析法の 2 つに大きく分けられる（Table 1）。免疫学的測定法は、薬物に対して特異的に結合する抗体を利用した測定法であり、また同時に複数検体の処理も可能であることから、簡便かつ迅速に行える測定法といえる。さらにオートメーション化された体外診断用医薬品として測定キットが多種類上市されており、免疫学的測定法は本邦における TDM の代表的な測定法となっている。しかしながら高価な抗体を用いるうえに、一抗体あたり一薬剤しか測定できないことから、ランニングコストが高価となることが問題点としてあげられる。さらに、代謝物や類似物質が存在する場合に生じる交差反応性 [79] や、検体の性状などにより偽陽性･偽陰性となることがあることが度々指摘されている [80–84]。

Table 1 The Characteristics summary of measurement principles used in clinical practice

	測定原理	交雑物による影響	代謝物による影響	測定感度	導入コスト	ランニングコスト
免疫学的測定法	抗体で測定対象を捕捉し、蛍光や発光を検出	受けにくい	受けやすい	良好	中程度	高い
液体クロマトグラフィー紫外可視分光検出法（LC-UV/Vis）	化学的物性により測定対象を分離して吸光度により検出	受けやすい	中程度	低い	中程度	低い
液体クロマトグラフィー蛍光検出法（LC-FL）	化学的物性により測定対象を分離して蛍光により検出	受けにくい	中程度	良好	中程度	中程度
液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）	化学的物性により測定対象を分離して荷電質量比による排他を行い、到達イオンを検出	中程度	中程度	中程度	高い	低い
液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（LC-MS/MS）	化学的物性により測定対象を分離して荷電質量比による排他を 2 回行い、到達イオンを検出	受けにくい	受けにくい	良好	非常に高い	低い

一方で分離分析法は、高価な抗体が入手困難な場合においても、標品を入手可能であれば構築可能な測定法である。同時に複数検体の分離可能ではないことから測定に時間を要するものの、複数の測定対象を一斉に分析することが可能であり、ランニングコストが安価な傾向にある。

医薬品の分離分析法は、液体クロマトグラフィー紫外可視分光検出法（LC-UV/Vis）、液体クロマトグラフィー蛍光検出法（LC-FL）、液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（LC-MS/MS）の 4 つに分類される。分離方法は共通しているがそれぞれ検出器が異なるため、各々の測定法の特徴を踏まえたうえで測定法を選択する必要があると考えられる。なかでもタンデム質量分析法（MS/MS）は質量分析計を機械内部で 2 台連結させることで、特定の質量電荷比のみ四重極内を通過させたのちに衝突室内でイオンを開裂させ、生じたプロダクトイオンのうち、測定対象に特徴的なイオンのみ衝突室奥の四重極内を通過させて検出を行うことで、高感度かつ高選択的な検出を可能とした画期的な質量分析計といえる。

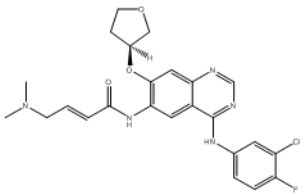
これらの背景を踏まえ、本研究では最も選択性が高くかつ時間の短縮が可能となる LC-MS/MS を用いた薬物の一斉分析計の構築を行った。対象薬物は、経口分子標的薬であるアファチニブ、アレクチニブ、クリゾチニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、レンバチニブ、ニロチニブ、オシメルチニブ、ポナチニブ、ソラフェニブの 12 薬物ならびに免疫抑制薬であるタクロリムス、エベロリムスの 2 薬物とした。

第二節 方法

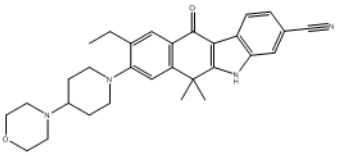
第一項 経口分子標的薬

試薬

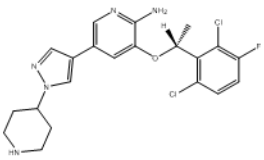
今回測定対象とした薬物および内部標準物質の構造式を Figure 1 に示す。アファチニブ、クリゾチニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、ニロチニブ、ソラフェニブおよびイマチニブメタンスルホン酸塩は、LC Laboratories Inc.（MA, US）から購入した。アレクチニブは Active Biochem Ltd.（NJ, USA）から購入した。レンバチニブは Eisai Co. Ltd.（Tokyo, Japan）から試薬の提供を受けた。オシメルチニブは Cayman Chemical Co.（MI, USA）から購入した。ポナチニブは、Adooq Bioscience Co.（CA, USA）から購入した。ロスコビチン、ジメチルスルホキシド（DMSO）およびギ酸（特級）は富士フィルム和光純薬株式会社（Osaka, Japan）から購入した。メタノール（液体クロマトグラフィー用）、ギ酸アンモニウム（特級）および分子生物用 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液はナカライテスク株式会社（Kyoto, Japan）から購入した。18.2 MΩ 超純水は、Elga Labo Water PURELAB flex system（Hgh Wycombe, UK）で精製したものを使用した。ガラスバイアル、0.22 μm PTFE フィルターは Merck（Darmstadt, Germany）より購入した。EDTA-2K 入り採血管はテルモ株式会社（Tokyo, Japan）より購入した。



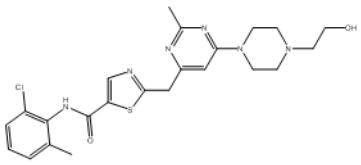
Afatinib



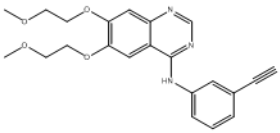
Alectinib



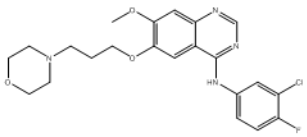
Crizotinib



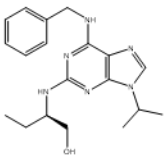
Dasatinib



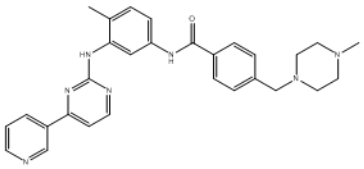
Erlotinib



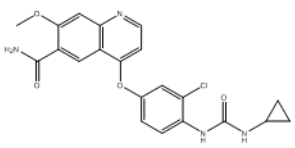
Gefitinib



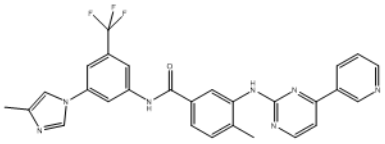
Roscovitine



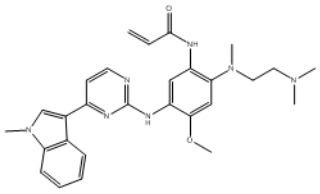
Imatinib



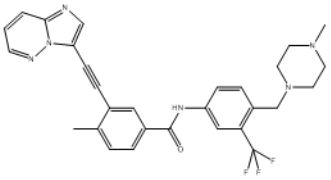
Lenvatinib



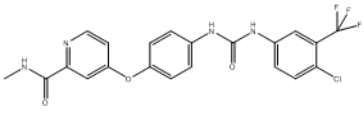
Nilotinib



Osimertinib



Ponatinib



Sorafenib

Figure 1 The structures of 12 oral molecular targeted drugs and roscovitine

LC-MS/MS の分析条件

各薬物のトランジション条件を Table 2 に示す。液体クロマトグラフィーは AB SCIEX（Tokyo, Japan）の AB SCIEX Eksigent Ekspert® UltraLC 100-XL system を用いた。分析用カラムは Waters（MA, USA）の ACQUITY® UPLC BEH C18 column（2.1 × 50 mm、1.7 μm）を使用した。移動相は 10 mM 酢酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液（移動相 A）と 10 mM 酢酸アンモニウム 0.1% ギ酸メタノール溶液（移動相 B）を用いた。流速は 0.25 mL/分に設定し、分析はグラジエント分析により行った。初期移動相は移動相 B の比率を 60%（v/v）とした。0.1 分間 60% を維持した後に 0.2 分かけて移動相 B の比率を 70% にした。その後、1.7 分かけて移動相 B の比率を 100% にした。移動相 B を 1 分間 100% で維持した後、初期移動相に戻し、4 分間かけて再平衡化を行った。オートサンプラーの温度は 20°C、カラムオーブンの温度は 50°C に設定した。

質量分析計は AB SCIEX（Tokyo, Japan）の AB SCIEX QTRAP® 4500 system を用いた。イオン化はエレクトロスプレーイオン化法（ESI）を選択し、全薬物ともポジティブモードによる多重反応モニタリング（MRM）で検出した。ロスコビチンを内部標準物質として使用した内標準法により定量を行い、データ解析は MultiQuant（version 2.1.1, AB SCIEX）で行った。イオン源温度は 600°C、イオン電圧は 5500 V、カーテンガスは 10 psi、コリジョンガスは 10 psi、ネブライザーガスは 60 psi、ドライングガスは 30 psi に設定した。

Table 2 The mass conditions of 12 oral molecular-targeted drugs and roscovitine

Drug Name	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Retention Time (min)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Afatinib $[M+H]^+$	487.1	371.8	1.77	120	40	15
Alectionib $[M+H]^+$	483.0	395.9	1.79	60	20	15
Crizotinib $[M+H]^+$	451.8	259.0	1.58	110	30	10
Dasatinib $[M+H]^+$	488.0	401.0	1.51	110	40	20
Erlotinib $[M+H]^+$	394.0	277.7	1.82	160	60	15
Gefitinib $[M+H]^+$	446.9	128.0	1.65	60	20	10
Imatinib $[M+H]^+$	494.0	393.9	1.42	60	55	15
Lenvatinib $[M+H]^+$	427.9	370.8	1.61	100	40	15
Nilotinib $[M+H]^+$	530.0	289.0	2.24	40	20	15
Osimertinib $[M+H]^+$	499.9	72.2	1.77	150	50	10
Ponatinib $[M+H]^+$	533.0	260.0	1.98	125	35	10
Roscovitine $[M+H]^+$	355.1	91.1	2.13	90	50	10
Sorafenib $[M+H]^+$	456.5	252.0	2.46	40	25	10

min, minutes; DP, Declustering Potential; CE, Collision Energy; CXP, Cell Exit Potential.

標準溶液、検量線標準用試料および品質管理試料の調製

アレクチニブを除くすべての薬物は 5 mg/mL となるように DMSO で溶解して一次ストック溶液を作成した。アレクチニブは、溶媒全般への溶解度が低いため、1 mg/mL となるように DMSO で溶解して一次ストック溶液を作成した。二次ストック溶液は、DMSO または水 : メタノール =1 : 1（v / v）のいずれか適切な希釈液を用いて希釈し、アファチニブ、ダサチニブ、ポナチニブ、レンバチニブは 100 μg/mL、アレクチニブ、クリゾチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ニロチニブ、オシメルチニブ、ソラフェニブは 500 μg/mL の濃度となるように希釈した。二次ストック溶液をさらに水 : メタノール = 1 : 1（v / v）で希釈し、6 種類の検量線用溶液と 3 種類の品質管理（QC）溶液を調製した。検量線用試料は、ブランク血漿 90 μL に検量線用溶液 10 μL を添加して作成した。また、QC 試料はブランク血漿 90 μL に QC 溶液 10 μL を添加して作成した。一次ストック溶液、二次ストック溶液、検量線用溶液、QC 溶液は 1.5 mL ポリプロピレンチューブに入れ、-30°C で保存した。

ヒト血漿での測定

測定には血漿を用いた。凝固予防にエチレンジアミン四酢酸二カリウム（EDTA-2K）で処理を行い、遠心（1,800 *g*、10 分、25°C）して血球成分か血漿を分離した。血漿試料、検量線用試料および QC 試料 50 μL に、25 ng/mL のロスコビチンを含むメタノール 250 μL を加え、10 分間ボルテックスした後に、遠心（13,000 *g*、10 分、25°C）して蛋白を沈殿させた。得られた上清 250 μL を水 250 μL で希釈し、PTFE フィルターで濾過して 1.5 mL ガラスバイアルに移したのち、5 μL を分析に供じた。

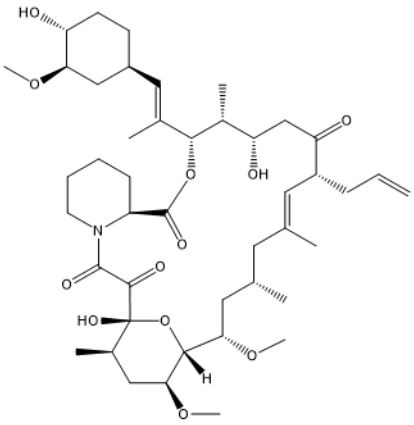
構築した分析法のバリデーション

医薬品開発における生体試料中薬物濃度測定を行う際には、測定系のバリデーションの実施が求められる。LC-MS/MS を用いた構築した測定法の妥当性を評価することを目的として、分析法のバリデーションを実施した。バリデーションは米国食品医薬品局（FDA）のバイオアナリティカルメソッドバリデーションのガイドライン[20]に基づいて実施した。選択性、検量線の直線性、日間再現性・日内再現性、マトリックスファクター、回収率および安定性についてバリデーションを実施した。

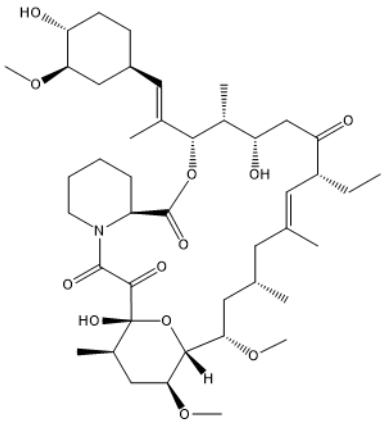
第二項 免疫抑制薬

試薬

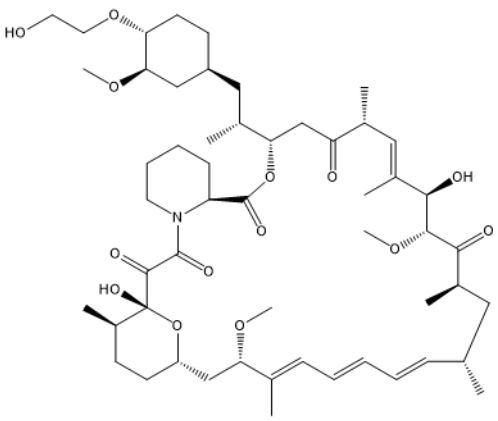
測定対象とした免疫抑制薬 3 種と内部標準物質の構造式を Figure 2 に示す。測定に使用したタクロリムスおよびエベロリムスは LC Laboratories Co.（MA, USA）から購入した。アスコマイシン、DMSO およびギ酸（特級）は富士フィルム和光純薬株式会社（Osaka, Japan）から購入した。メタノール（液体クロマトグラフィー用）およびギ酸アンモニウム（特級）はナカライテスク株式会社（Kyoto, Japan）から購入した。18.2 MΩ 超純水は、Elga Labo Water PURELAB flex system（Hgh Wycombe, UK）で精製したものを使用した。300 μL ポリプロピレンバイアルは Waters（MA, USA）より購入した。エベロリムス-d4 溶液は Cerilliant Co.（TX, USA）から購入した。EDTA-2K 入り採血管はテルモ株式会社（Tokyo, Japan）より購入した。



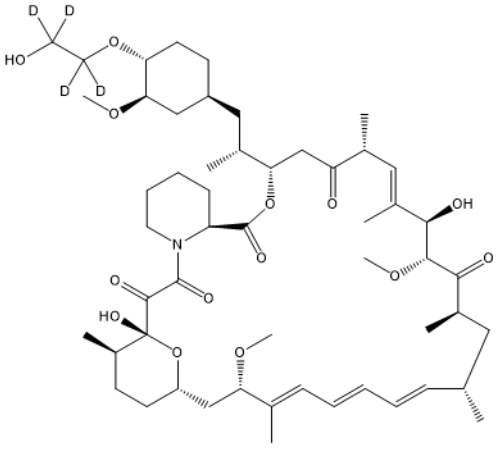
Tacrolimus



Ascomycin



Everolimus



Everolimus-d4

Figure 2 The structure of immunosuppressant drugs

LC-MS/MS の分析条件

各薬物の定量および定性のトランジションを Table 3 に示す。液体クロマトグラフの送液ポンプは島津製作所（Kyoto, Japan）の Nexera X2 LC-30AD を、カラムオーブンは同社の CTO-20AC、オートサンプラーは同社の Nexera X2 SIL-30AC を使用し、質量分析計も同社の LCMS-8050™ を用いた。カラムは Waters（MA, USA）の ACQUITY® UPLC BEH C18 column（2.1 × 50 mm、1.7 μm）を使用し、移動相 A は 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液を、移動相 B は 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸メタノール溶液を使用してグラジエント分析を行った。流速は 0.5 mL/分とし、初期溶媒は移動相 B を 50% とし、0.5 分間 50% で維持したのち 1 分かけて移動相 B を 70% 、続いて 0.3 分間かけて移動相 B を 100% へと変化させた。1.2 分間移動相 B を 100% で維持したのち初期溶媒に戻して再平衡化を行い、1 サイクル 5 分で分析を行った。オートサンプラーの温度は 4°C、カラムオーブンの温度は 40°C に設定した。質量分析計のネブライザーガス、ドライングガス、ヒーティングガスはそれぞれ 3 L/分、10 L/分、10 L/分とした。インターフェイス温度、脱溶媒温度、ヒートブロック温度、インターフェイス電圧はそれぞれ 300°C、250°C、および 400°C とし、ESI ポジティブモードで検出を行った。すべての薬物は$[M+Na]^+$で検出した。

ストック溶液の調製

5 mg/mL となるように DMSO で溶解してタクロリムスおよびエベロリムスの一次ストック溶液を作成した。

Table 3 Monitored transitions, collision voltages and retention times of immunosuppressant drugs and internal standards

Drug Name	Mode	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	CV (V)	Retention Time (min)
Ascomycin $[M+Na]^+$	Quantitative	815.0	604.0	-40	2.511
	Qualitative	815.0	375.0	-50	
Everolimus-d4 $[M+H]^+$	Quantitative	985.0	393.0	-60	2.523
	Qualitative	985.0	409.0	-60	
Everolimus $[M+Na]^+$	Quantitative	981.0	389.0	-60	2.522
	Qualitative	981.0	409.0	-60	
Tacrolimus $[M+Na]^+$	Quantitative	827.0	617.0	-35	2.512
	Qualitative	827.0	415.0	-50	

min, minutes; CV, Collision Voltage.

ヒト全血での測定

測定には凝固予防に EDTA-2K で処理を行った全血を用いた。対象薬物はタクロリムスとエベロリムスのみとした。5 mg/mL の一次ストック溶液を水 : メタノール = 1 : 1（v / v）で希釈し、9 μg/mL の二次ストック溶液を作成した。二次ストック溶液をさらに水 : メタノール = 1 : 1（v / v）で希釈し、9、18、45、90、180、360 ng/mL の検量線用溶液を作成した。ヒト全血 180 μL に対して作成した検量線用溶液 20 μL をスパイクし、ボルテックスして検量線用試料を作成した。また全血試料 180 μL に対して水 : メタノール = 1 : 1 (v / v) 20 μL を添加し、ボルテックスして測定用試料を作成した。作成した検量線用試料および測定用試料 200 μL に対して 0.5 mol/L 硫酸亜鉛水溶液 : 内部標準物質入りメ

タノール = 3 : 7 (v / v) 400 μL を加え、ボルテックスした。遠心（20,000 *g*、5 分、25°C）を行い、得られた上清 450 μL を Waters（MA, USA）の HLB μElution Plate に負荷した。超純水 600 μL ついで水 : メタノール = 1 : 1 (v / v) 600 μL で固相を洗浄した。30 分間窒素ガスを吹きかけて固相を乾燥させたのちに 50 μL のメタノールで固相から目的物を抽出し、300 μL ポリプロピレンバイアルに移したのち、2 μL を分析に供じた。

分析バリデーションの評価項目

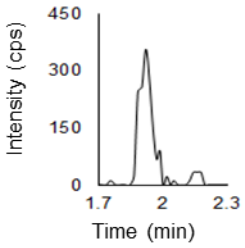
第一項 経口分子標的薬の項目に準じて実施した。

第三節 結果

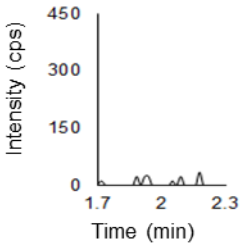
選択性

6 個体から得られた個別のブランクマトリックスを用いて選択性を評価した。測定対象薬物や内部標準物質に干渉するピークの有無を評価した。許容基準は FDA のバリデーションガイドラインに則り、測定対象と重なるピークが観測されない、または観測された場合そのレスポンス（ピーク高さ）が測定対象の LLOQ のレスポンスの 20% 以内であることを許容水準とした。内部標準物質はレスポンスの 5% 以内であることを許容水準とした。経口分子標的薬の一斉分析における各薬物の LLOQ のクロマトグラムと、ブランクマトリックスのクロマトグラムの一部を Figure 3 に示す。ブランクマトリックスには対象薬物を服用していないヒトの血漿を用いた。6 個体すべてのブランクマトリックスにおいて内部標準物質および測定薬物に重なるピークは検出されなかった。また Figure 4 に免疫抑制薬の同時分析系における各薬物の LLOQ のクロマトグラム（a）と全てのブランクマトリックス（b, c, d, e, f, g）のクロマトグラムを示す。タクロリムスにおいて一部ブランクから重なるピークが検出された。LLOQ のピーク高さは 6000 cps であり、認められたピークはいずれも 20% にあたる 1200 cps 以下であった。アスコマイシン・エベロリムス・エベロリムス-d4 は重なるピークが確認されなかった。

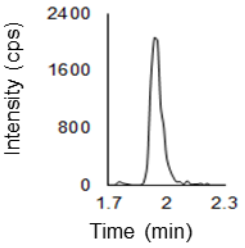
Afatinib
487.1→371.8



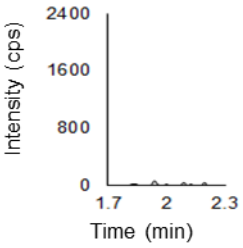
Blank no.1
487.1→371.8



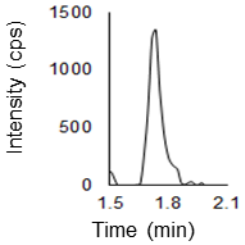
Alectinib
483.0→395.9



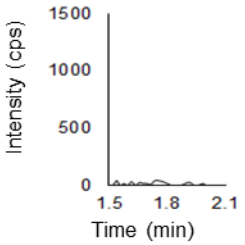
Blank no.1
483.0→395.9



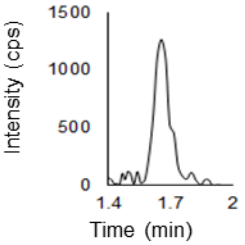
Crizotinib
451.8→259.0



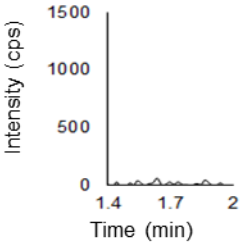
Blank no.1
451.8→259.0



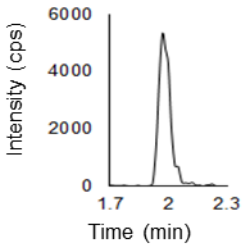
Dasatinib
488.0→401.0



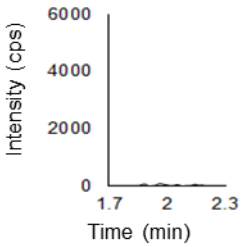
Blank no.1
488.0→401.0



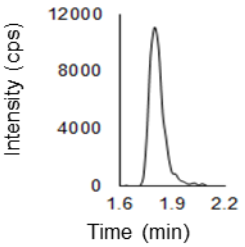
Erlotinib
394.0→277.7



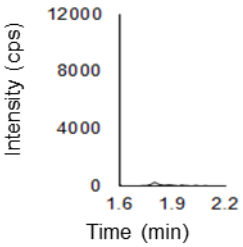
Blank no.1
394.0→277.7



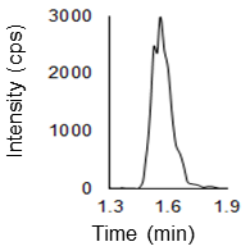
Gefitinib
446.9→128.0



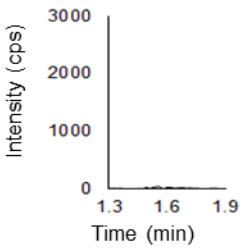
Blank no.1
446.9→128.0



Imatinib
494.0→393.9



Blank no.1
494.0→393.9



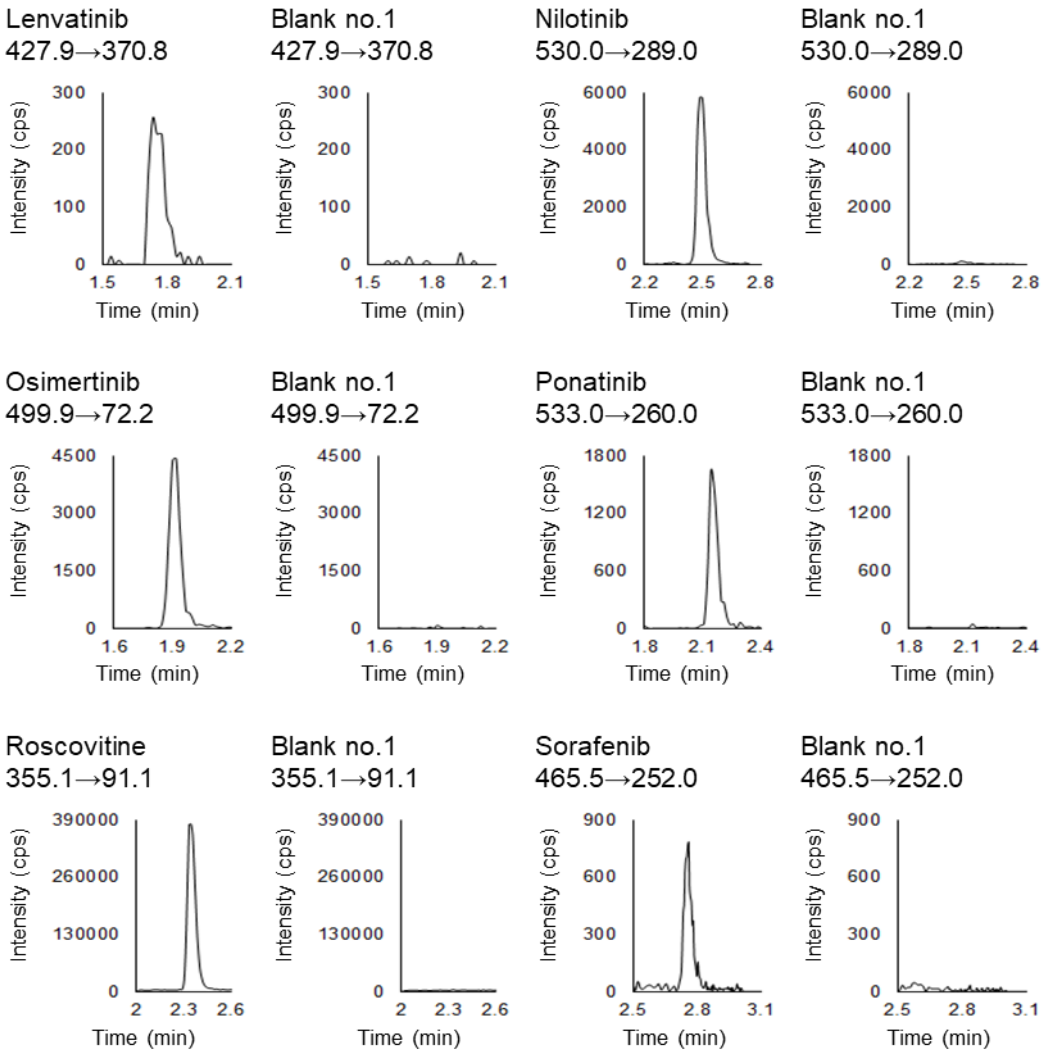
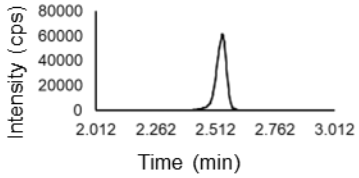


Figure 3 Evaluation of the selectivity of 12 oral molecular-targeted drugs

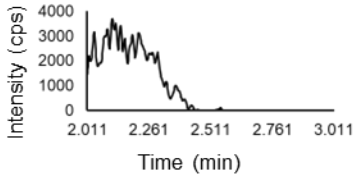
The chromatography of the LLOQ samples containing all of detected drugs and the negative control. In assay, plasma of patients treated with multiple medications was used as blank plasma. The vertical line shows the intensity (count per second) and the horizontal one time (minutes).

(1) Ascomycin 815→604

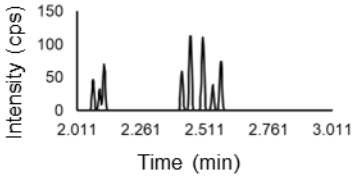
(a) LLOQ



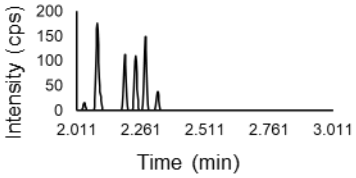
(b) Blank no.1



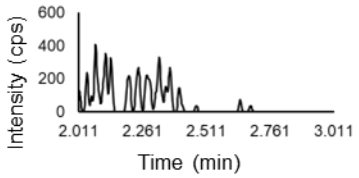
(c) Blank no.2



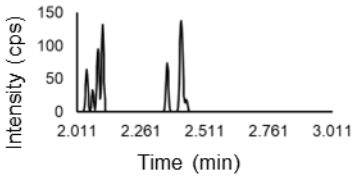
(d) Blank no.3



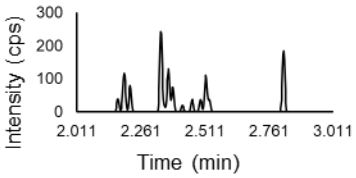
(e) Blank no.4



(f) Blank no.5

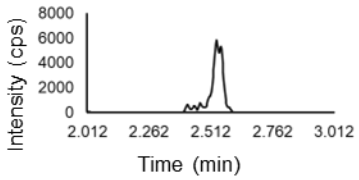


(g) Blank no.6

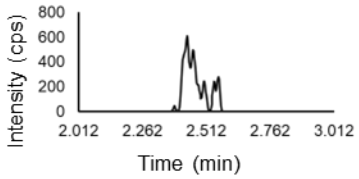


(2) Tacrolimus 827→617

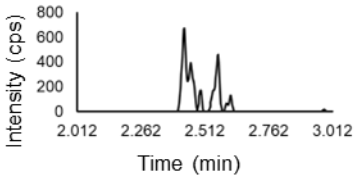
(a) LLOQ



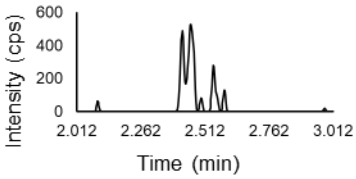
(b) Blank no.1



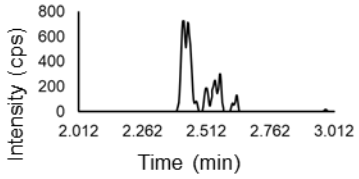
(c) Blank no.2



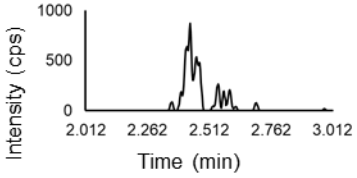
(d) Blank no.3



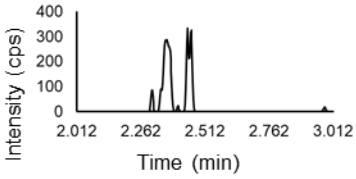
(e) Blank no.4



(f) Blank no.5



(g) Blank no.6



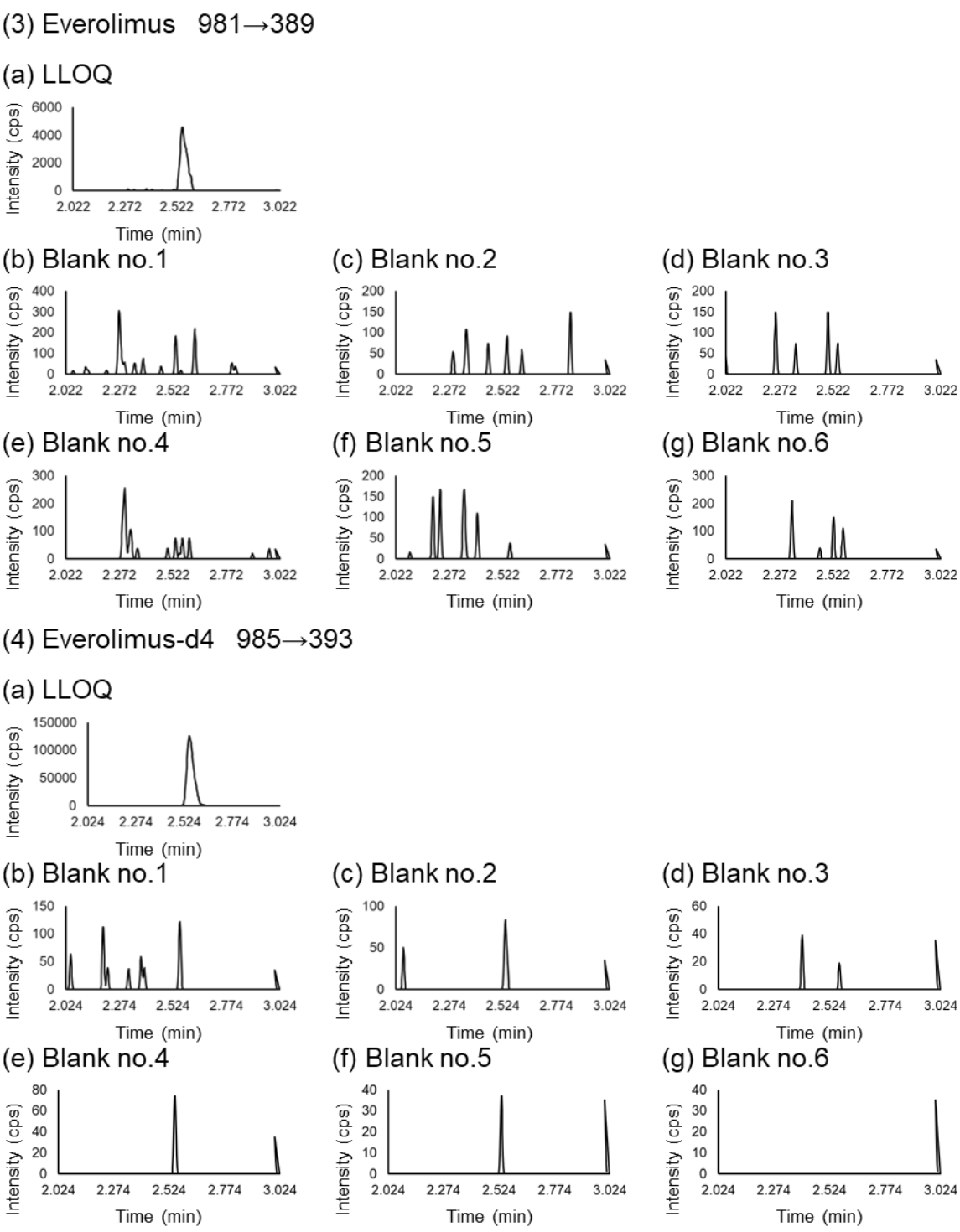


Figure 4 Evaluation of the selectivity of immunosuppressant drugs

The chromatograph of ascomycin (1), tacrolimus (2), everolimus (3), everolimus-d4 (4). Representative chromatograph from spike whole blood at the LLOQ for each drug (a), and from 6 individual blank whole blood sample (b, c, d, e, f, g). The vertical line shows the intensity (count per second) and the horizontal one time (minutes).

検量線

検量線の範囲は、添付文書に記載されている治験時の血中薬物濃度をもとに設定した。分析薬物と内部標準物質のピーク面積比をシグナル強度として回帰式を算出した。検量線は 6 濃度の検量線用試料を用いて作成し、検量線の回帰式には $1/x^2$ の重み付けを行った。許容基準は FDA のバリデーションガイドラインに則り、検量線の決定係数が 0.99 以上、かつ回帰式から求めた検量線用試料の各濃度の真度がすべて 100±15% 以内であることとした。真度とは検量線より得られた定量値と理論値との乖離の程度を示し、定量値を理論値で除したのちに 100 を乗じて求めた。経口分子標的薬の一斉測定系の検量線範囲、QC 試料の設定濃度および回帰式を Table 4 に、免疫抑制薬の同時分析系の検量線範囲、QC 試の設定濃度および回帰式を Table 5 に示す。ヒト血漿における経口分子標的薬の一斉測定系において、アファチニブ、ダサチニブ、レンバチニブおよびポナチニブは 1 – 200 ng/mL の範囲で直線性を示し、アレクチニブ、クリゾチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、オシメルチニブは 5 – 1000 ng/mL の範囲で、イマチニブ、ニロチニブ、ソラフェニブは 25 – 5000 ng/mL の範囲でそれぞれ直線性を示した。また、免疫抑制薬における測定系においてタクロリムスおよびエベロリムスは 1 – 40 ng/mL で直線性を示した。経口分子標的薬の一斉測定系、免疫抑制薬の同時分析系で全測定対象薬物の検量線の決定係数は 0.99 以上であり、回帰式から求めた検量線用試料の真度はすべて 100±15% 以内であった（データ未収載）。これらのことから、全測定対象薬物において FDA のバリデーションガイドラインの基準を満たしていることが示された。

Table 4 Calibration range and quality control concentration of 12 oral molecular-targeted drugs

Drug name	Calibration range (ng/mL)	QC concentration (ng/mL)			Regression equation
		LQC	MQC	HQC	
Afatinib	1 — 200	3	75	150	y= 0.00154 x + 0.00031
Alectinib	5 — 1000	15	375	750	y= 0.00167 x - 0.00024
Crizotinib	5 — 200	15	75	150	y= 0.00112 x + 0.00169
Dasatinib	1 — 200	3	75	150	y= 0.00822 x - 0.00093
Erlotinib	5 — 1000	15	375	750	y= 0.00323 x + 0.00553
Gefitinib	5 — 1000	15	375	750	y= 0.01024 x + 0.00118
Imatinib	25 — 5000	75	1875	3750	y= 0.00091 x - 0.00191
Lenvatinib	1 — 200	3	75	150	y= 0.00130 x + 0.00034
Nilotinib	25 — 5000	75	1875	3750	y= 0.00120 x - 0.00310
Osimertinib	5 — 1000	15	375	750	y= 0.00450 x - 0.02584
Ponatinib	1 — 200	3	75	150	y= 0.00711 x + 0.00008
Sorafenib	25 — 5000	75	1875	3750	y= 0.00007 x - 0.00004

LQC, low quantitation control; MQC, middle quantitation control; HQC, high quantitation control.

Table 5 Calibration range and quality control concentration of immunosuppressant drugs

Drug name	Calibration range (ng/mL)	QC concentration (ng/mL)			Regression equation
		LQC	MQC	HQC	
Tacrolimus	1 — 40	3	15	30	y= 0.08704 x + 0.02717
Everolimus	1 — 40	3	15	30	y= 0.04525 x + 0.00324

LQC, low quantitation control; MQC, middle quantitation control; HQC, high quantitation control.

日内変動と日間変動

日内または日間の繰り返し分析時の真度および精度は、検量線範囲の定量下限（LLOQ）および 3 濃度の QC（LQC、MQC、HQC）試料を用いて、1 濃度につき 5 回、5 日間にわたって反復したもので評価した。真度は検量線の項と同様の方法で求めた。精度とは繰り返し分析の際の定量値のばらつきの程度を表し、変動係数（C.V.%）を求めることで評価した。C.V.% は、繰り返し分析で得られた定量値の標準偏差と平均値をそれぞれ求めて、標準偏差を平均値で除したのちに 100 を乗じて求めた。許容基準は FDA のバリデーションガイドラインに則り、QC の真度と精度はそれぞれ 100±15% 以内と 15% 以下、LLOQ の真度と精度はそれぞれ 100±20% 以内と 20% 以下とした。経口分子標的薬の一斉測定系の繰り返し分析時の真度と精度を Table 6 に、免疫抑制薬の同時分析系の真度と精度を Table 7 に示す。全薬物で真度は日内および日間ともに 100±15% 以内であった。また精度も日内および日間ともにすべて 15% 以下であったことから、全測定対象薬物において FDA のバリデーションガイドラインの基準を満たしていることが示された。

Table 6 Intra-day and Inter-day accuracy and precision (n=5) for 12 oral molecular-targeted drugs

QC Level	Afatinib			Dasatinib		
	Inter-day Accuracy	Intra-day Precision	Inter-day Precision	Inter-day Accuracy	Intra-day Precision	Inter-day Precision
LLOQ	99.2	13.8	4.4	103.4	4.5	11.2
LQC	89.8	4.4	1.3	94.7	4.0	5.5
MQC	99.0	2.0	6.1	90.2	2.4	1.5
HQC	98.0	2.3	5.8	92.4	2.7	5.9
QC Level	Lenvatinib			Ponatinib		
	Inter-day Accuracy	Intra-day Precision	Inter-day Precision	Inter-day Accuracy	Intra-day Precision	Inter-day Precision
LLOQ	101.0	4.3	6.5	96.4	3.2	11.6
LQC	97.0	4.8	6.2	94.4	4.0	6.3
MQC	95.7	1.3	5.0	90.2	3.2	6.2
HQC	96.5	2.5	5.2	93.6	2.6	5.1
QC Level	Alectinib			Crizotinib		
	Inter-day Accuracy	Intra-day Precision	Inter-day Precision	Inter-day Accuracy	Intra-day Precision	Inter-day Precision
LLOQ	95.0	2.8	7.9	91.3	14.4	6.9
LQC	94.3	3.5	5.8	98.5	4.2	4.8
MQC	96.9	2.4	3.7	95.8	3.1	2.8
HQC	102.9	2.7	5.0	97.9	3.2	4.5

QC Level	Erlotinib			Gefitinib		
	Inter-day Accuracy	Intra-day Precision	Inter-day Precision	Inter-day Accuracy	Intra-day Precision	Inter-day Precision
LLOQ	93.0	5.9	6.3	108.2	1.6	3.4
LQC	105.9	6.2	4.0	96.9	2.2	7.7
MQC	104.4	1.7	5.4	101.5	2.5	5.8
HQC	103.4	2.8	3.4	101.2	3.5	7.1
QC Level	Osimertinib			Imatinib		
	Inter-day Accuracy	Intra-day Precision	Inter-day Precision	Inter-day Accuracy	Intra-day Precision	Inter-day Precision
LLOQ	101.6	2.4	8.9	95.5	2.9	8.7
LQC	94.0	3.3	7.6	96.3	3.3	5.8
MQC	88.6	2.6	3.4	92.8	1.9	3.9
HQC	90.7	3.2	3.7	96.1	2.7	7.5
QC Level	Nilotinib			Sorafenib		
	Inter-day Accuracy	Intra-day Precision	Inter-day Precision	Inter-day Accuracy	Intra-day Precision	Inter-day Precision
LLOQ	98.5	1.9	8.8	96.2	6.1	7.6
LQC	90.7	1.6	4.0	94.2	4.4	4.0
MQC	96.7	2.0	8.9	95.2	3.5	1.0
HQC	100.6	1.1	10.2	90.6	2.1	4.4

LLOQ, lower limit of quantification; LQC, low quantitation control; MQC, middle quantitation control; HQC, high quantitation control.

Table 7 Intra-day and Inter-day accuracy and precision (n=5) for immunosuppressant drugs

QC Level	Tacrolimus			Everolimus		
	Inter-day Accuracy	Intra-day Precision	Inter-day Precision	Inter-day Accuracy	Intra-day Precision	Inter-day Precision
LLOQ	107.9	13.6	10.5	99.3	12.6	9.4
LQC	99.8	3.4	7.4	100.2	5.5	9.9
MQC	100.4	3.2	2.7	103.5	3.4	8.5
HQC	101.6	3.1	3.7	102.6	1.2	6.1

LLOQ, lower limit of quantification; LQC, low quantitation control; MQC, middle quantitation control; HQC, high quantitation control.

回収率・マトリックスファクター

マトリックスに含まれる内因性物質や外因性物質の影響により、イオン化効率の変化や前処理時の抽出効率にばらつきが生じ、真の値から測定値が乖離することがある。そのため、イオン化効率の変化や前処理時の抽出効率のばらつきを、それぞれマトリックスファクターおよび回収率として評価する必要がある。マトリックスファクターおよび回収率は LQC、MQC、HQC を用いて行った。

マトリックスファクターは、6 個体のブランクマトリックスを用いて評価した。マトリックスファクターは、マトリックスが存在する場合のピーク面積と、マトリックスが存在しない場合のピーク面積の比として算出した。

回収率も同様に 6 個体のブランクマトリックスを用いて評価した。回収率は抽出前に薬物を添加した試料を前処理した際のピーク面積と抽出後に薬物を添加したもののピーク面積の比を計算することで求めた。

求めたそれぞれの値を使用して C.V.% を求め、マトリックス間のばらつきの度合いとしてマトリックスファクターおよび回収率を評価した。許容基準は FDA のバリデーションガイドラインに則り、15% 以内とした。測定対象がこの基準を満たさない場合も内部標準物質で補正を行うことで 15% 以内となる場合は、基準を満たすものとした。経口分子標的薬の一斉測定系のマトリックスファクターを Table 8 に、回収率を Table 9 に、免疫抑制薬の同時分析系のマトリックスファクターを Table 10 に、回収率を Table 11 に示す。経口分子標的薬の一斉測定系における内部標準物質と各薬剤の回収率およびマトリックスファクターの C.V.% は全て 15% 以下であった。免疫抑制薬の同時分析系ではタクロリムス、エベロリムスともにマトリックスファクターの C.V.% が 15% を上回ったが、内部標準物質で補正した C.V.% は 15% 以下であった。また回

収率の C.V.% はすべての化合物で 15% 以下であり、内部標準物質で補正した C.V.% も 15% 以下となった。以上より、マトリックスファクター・回収率ともに全測定対象薬物において FDA のバリデーションガイドラインの基準を満たしていることが示された。

Table 8 Matrix factor value of 12 oral molecular-targeted drugs (n = 5)

Drug name	Matrix factor (Average ratio, range)						Matrix factor (C.V.%)		
	LQC		MQC		HQC		LQC	MQC	HQC
Afatinib	112.2	(104.8 – 127.8)	105.3	(89.3 – 115.0)	90.5	(86.0 – 94.2)	6.67	7.70	2.71
Alectinib	101.7	(94.2 – 112.1)	106.0	(85.0 – 113.4)	89.2	(84.9 – 92.7)	5.75	9.30	3.16
Crizotinib	97.2	(89.6 – 104.2)	101.9	(85.9 – 109.0)	93.3	(90.1 – 99.3)	6.21	7.71	3.32
Dasatinib	100.1	(91.6 – 114.0)	105.9	(86.1 – 114.3)	95.5	(92.5 – 99.2)	7.48	9.07	2.85
Erlotinib	103.1	(97.4 – 107.7)	109.8	(91.6 – 117.8)	90.5	(86.9 – 94.8)	3.37	7.80	3.28
Gefitinib	101.6	(95.7 – 110.6)	102.8	(88.3 – 109.3)	94.4	(91.1 – 100.2)	4.55	6.68	3.22
Imatinib	97.5	(89.2 – 113.0)	103.2	(85.5 – 111.0)	93.0	(86.6 – 98.8)	8.07	8.23	4.63
Lenvatinib	98.8	(91.5 – 109.3)	99.4	(85.9 – 106.6)	93.4	(88.5 – 98.9)	5.78	6.57	3.34
Nilotinib	96.7	(87.8 – 100.4)	101.5	(77.3 – 111.9)	87.5	(83.7 – 94.8)	5.44	11.65	4.81
Osimertinib	97.7	(88.6 – 116.9)	109.1	(86.3 – 117.8)	90.2	(81.5 – 94.8)	9.65	9.72	5.38
Ponatinib	95.8	(88.6 – 102.9)	111.5	(79.7 – 128.1)	82.1	(68.7 – 89.8)	5.64	13.87	8.50
Roscovitine	102.2	(94.6 – 107.5)	95.6	(84.3 – 104.2)	93.6	(92.1 – 96.6)	5.68	6.98	1.60
Sorafenib	101.5	(90.7 – 107.8)	100.1	(84.6 – 107.2)	92.2	(90.0 – 95.5)	5.25	7.89	2.36

LQC, low quantitation control; MQC, middle quantitation control; HQC, high quantitation control; Matrix factor, the peak area in the presence of matrix / the peak area in the absence of matrix, C.V.%, coefficient of variation percent.

Table 9 Recovery value of 12 oral molecular-targeted drugs (n = 5)

Drug name	Recovery (Average ratio, range)						Recovery (C.V.%)		
	LQC		MQC		HQC		LQC	MQC	HQC
Afatinib	106.9	(97.7 – 112.7)	99.0	(93.2 – 103.0)	93.9	(87.5 – 99.3)	5.40	3.50	4.52
Alectinib	94.2	(89.3 – 97.8)	99.5	(92.8 – 106.8)	97.5	(89.8 – 102.5)	3.48	4.62	4.50
Crizotinib	95.9	(91.9 – 99.9)	95.6	(87.6 – 100.4)	94.1	(85.8 – 98.8)	2.62	4.38	5.05
Dasatinib	95.9	(92.2 – 101.0)	99.3	(93.0 – 103.4)	97.8	(91.9 – 101.0)	2.81	3.44	3.11
Erlotinib	92.7	(82.2 – 104.6)	97.0	(89.0 – 102.9)	92.5	(88.9 – 96.6)	8.83	4.51	3.04
Gefitinib	102.0	(100.0 – 103.6)	96.3	(91.5 – 100.4)	96.4	(88.0 – 100.5)	1.39	3.01	4.76
Imatinib	96.0	(92.7 – 99.0)	101.2	(92.3 – 107.7)	101.2	(93.3 – 106.2)	2.26	5.30	4.24
Lenvatinib	88.4	(84.3 – 93.5)	95.5	(88.5 – 100.6)	97.1	(87.8 – 103.8)	3.94	3.98	5.43
Nilotinib	92.7	(89.4 – 94.9)	101.2	(97.2 – 109.3)	103.9	(98.4 – 107.7)	1.83	4.17	3.00
Osimertinib	95.9	(93.6 – 100.3)	101.8	(93.5 – 110.8)	97.6	(86.8 – 102.3)	2.28	5.99	5.45
Ponatinib	92.5	(89.2 – 92.5)	104.3	(94.6 – 114.3)	103.1	(92.0 – 111.0)	1.76	6.73	5.85
Roscovitine	110.9	(108.4 – 113.6)	116.3	(111.4 – 121.1)	100.4	(98.4 – 105.8)	1.67	2.79	2.53
Sorafenib	96.7	(94.1 – 101.0)	94.5	(90.7 – 99.0)	100.3	(97.0 – 103.5)	2.19	2.76	2.18

LQC, low quantitation control; MQC, middle quantitation control; HQC, high quantitation control; C.V.%, coefficient of variation percent;

Recovery, the peak area spiked before extraction / the peak area spiked after extraction.

Table 10 Matrix factor value of immunosuppressant drugs (n = 6)

Drug name	Matrix factor (Average ratio, range)						Matrix factor (C.V.%)		
	LQC		MQC		HQC		LQC	MQC	HQC
Tacrolimus	23.9	(17.3 – 28.9)	28.5	(22.0 – 33.2)	30.6	(22.3 – 35.0)	17.80	13.94	15.50
Everolimus	21.5	(25.5 – 36.3)	34.8	(23.6 – 38.6)	42.3	(26.7 – 35.3)	16.57	21.24	17.56
Ascomycin	22.5	(20.5 – 24.0)	26.9	(22.2 – 32.4)	33.2	(25.0 – 37.9)	5.89	14.30	14.67
Everolimus-d4	31.9	(27.6 – 40.2)	41.7	(28.4 – 40.5)	48.7	(26.3 – 35.7)	19.95	21.68	18.78
cTacrolimus	105.8	(82.5 – 122.5)	106.1	(98.8 – 114.8)	92.2	(89.2 – 101.0)	13.31	5.39	4.41
cEverolimus	68.2	(78.2 – 111.4)	83.7	(83.1 – 101.6)	87.1	(85.4 – 103.4)	13.98	5.48	4.59

LQC, low quantitation control; MQC, middle quantitation control; HQC, high quantitation control; C.V.%, coefficient of variation percent; Matrix factor, the peak area in the presence of matrix / the peak area in the absence of matrix; cTacrolimus, matrix factor value of tacrolimus corrected by internal standard; cEverolimus, matrix factor value of everolimus corrected by internal standard.

Table 11 Recovery value of immunosuppressant drugs (n = 6)

Drug name	Recovery (Average ratio, range)						Recovery (C.V.%)		
	LQC		MQC		HQC		LQC	MQC	HQC
Tacrolimus	40.0	(33.7 – 46.8)	41.2	(38.1 – 43.4)	40.4	(37.1 – 43.6)	11.45	4.54	5.11
Everolimus	30.3	(25.6 – 33.7)	33.4	(30.2 – 36.5)	35.0	(32.9 – 36.9)	9.71	7.37	3.73
Ascomycin	41.5	(36.6 – 44.4)	43.3	(39.1 – 46.4)	43.7	(39.8 – 46.6)	5.98	5.64	5.28
Everolimus-d4	42.3	(39.0 – 46.0)	44.3	(35.4 – 46.9)	43.7	(40.8 – 48.3)	5.73	9.33	5.69
cTacrolimus	96.4	(82.0 – 114.4)	95.3	(87.8 – 98.5)	92.8	(85.6 – 105.7)	10.82	3.89	7.14
cEverolimus	71.9	(60.8 – 82.0)	76.0	(64.4 – 86.2)	80.4	(73.0 – 86.9)	10.98	9.24	6.16

LQC, low quantitation control; MQC, middle quantitation control; HQC, high quantitation control; C.V.%, coefficient of variation percent; Recovery, the peak area spiked before extraction / the peak area spiked after extraction; cTacrolimus, recovery value of tacrolimus corrected by internal standard; cEverolimus, recovery value of everolimus corrected by internal standard.

安定性

分析対象物の安定性として、短期保存安定性、長期保存安定性、2 項目を LQC、MQC、HQC を用いて評価した。短期保存安定性は、室温または 5°C を保管条件とし、最長 72 時間を評価した。長期保存安定性は-80°C を保管条件とし、最長 1 ヵ月を評価した。各濃度異なる 5 試料で測定を行い、平均真度で評価した。真度は検量線の項と同様の方法で求めた。許容基準は FDA のバリデーションガイドラインに則り、100±15% 以内とした。

経口分子標的薬の一斉測定系の各条件における安定性を Table 12 に、免疫抑制薬の同時分析系の各条件における安定性を Table 13 に示す。オシメルチニブを除くすべての薬物で、表中の条件における安定性は 90% 以上であった。室温で保存した場合のオシメルチニブの安定性には経時的な低下が認められ、6 時間後には約 40% まで薬物濃度が低下し、基準を逸脱した。タクロリムスおよびエベロリムスの安定性は室温下で 24 時間、5°C 保管で 72 時間、-80°C 保管で 4 週間という保存条件において、測定値がほぼ変化することなく推移していた。

以上より経口分子標的薬において、FDA のバリデーションガイドラインの基準を満たす保管可能な条件は、5°C 保管で 6 時間または-30°C 保管で 3 日間であることが示された。また免疫抑制薬において、FDA のバリデーションガイドラインの基準を満たす保管可能な条件は、室温下で 24 時間、5°C 保管で 72 時間、-80°C 保管で 4 週間であることが示された。

Table 12 Stability of 12 oral molecular-targeted drugs under various conditions (n = 5)

QC Level	Afatinib			Dasatinib		
	6 h at 5°C	6 h at 25°C	3 days at -30°C	6 h at 5°C	6 h at 25°C	3 days at -30°C
LQC	91.8	78.1	108.8	102.1	101.2	103.0
MQC	98.8	94.2	104.1	98.3	99.7	103.2
HQC	102.1	91.3	104.7	104.9	104.4	100.3
QC Level	Lenvatinib			Ponatinib		
	6 h at 5°C	6 h at 25°C	3 days at -30°C	6 h at 5°C	6 h at 25°C	3 days at -30°C
LQC	109.0	112.8	111.0	102.3	104.8	104.3
MQC	94.0	95.4	101.6	102.0	98.9	101.0
HQC	102.1	100.0	100.6	102.5	91.9	98.1
QC Level	Alectinib			Crizotinib		
	6 h at 5°C	6 h at 25°C	3 days at -30°C	6 h at 5°C	6 h at 25°C	3 days at -30°C
LQC	103.5	94.5	110.7	102.1	97.5	102.6
MQC	100.3	102.2	100.0	97.5	98.5	97.2
HQC	106.0	100.9	104.4	104.9	104.1	101.0

QC Level	Erlotinib			Gefitinib		
	6 h at 5°C	6 h at 25°C	3 days at -30°C	6 h at 5°C	6 h at 25°C	3 days at -30°C
LQC	100.4	100.6	108.8	99.0	96.7	104.9
MQC	102.7	105.4	98.0	99.2	101.6	104.8
HQC	108.7	113.2	104.6	105.1	103.0	104.0
QC Level	Osimertinib			Imatinib		
	6 h at 5°C	6 h at 25°C	3 days at -30°C	6 h at 5°C	6 h at 25°C	3 days at -30°C
LQC	98.4	49.5	103.7	102.4	101.4	105.6
MQC	91.8	32.7	102.8	96.6	95.7	94.7
HQC	95.3	32.5	101.5	100.7	97.6	102.9
QC Level	Nilotinib			Sorafenib		
	6 h at 5°C	6 h at 25°C	3 days at -30°C	6 h at 5°C	6 h at 25°C	3 days at -30°C
LQC	105.5	104.7	110.5	109.5	117.1	110.1
MQC	100.4	100.7	102.5	102.0	80.6	99.2
HQC	100.1	97.4	104.7	97.4	94.4	91.6

LQC, low quantitation control; MQC, middle quantitation control; HQC, high quantitation control.

Table 13 Stability of immunosuppressant drugs under various conditions (n = 5)

QC Level	Tacrolimus			Everolimus		
	72 h at 5°C	24 h at 25°C	4 weeks at -80°C	72 h at 5°C	24 h at 25°C	4 weeks at -80°C
LQC	108.5	93.1	104.0	93.0	99.4	100.0
MQC	104.0	97.3	95.8	98.1	101.2	96.8
HQC	102.1	98.7	97.9	100.0	105.9	99.3

LQC, low quantitation control; MQC, middle quantitation control; HQC, high quantitation control.

第四節 考察

今回構築した経口分子標的薬の一斉分析系および免疫抑制薬の同時測定系について FDA のバイオアナリティカルメソッドバリデーションのガイドラインに基づいてバリデーションを実施した [20]。評価した項目は両分析系において FDA のバリデーションガイドラインの基準を満たす結果であった。

選択性を評価した結果から、2 つの分析系を通して、タクロリムスを除くすべての測定対象薬物と 3 つの内部標準物質で、ブランクマトリックスから干渉するピークは検出されなかった。ピークの高さでタクロリムスの選択性を評価した結果、干渉ピークの見られた Blank no.1 および Blank no.2（Figure 4）ともにブランクマトリックスから得られたレスポンスは LLOQ の 20% 以内であり、FDA のバリデーションガイドラインの基準を満たす結果であった。

経口分子標的薬では定量上限が定量下限の 200 倍（Table 4）となっているダイナミックレンジでの定量を可能としており、最高血中濃度から内服前血中濃度まで測定可能であった。また免疫抑制薬の同時測定系では両薬物とも 1 – 40 ng/mL の範囲で測定可能であった。2 つの分析系とも繰り返し分析時の全濃度における精度が日間・日内いずれも 15% 以下であり（Table 6 および Table 7）、バリデーションガイドラインの基準を満たしたことから、測定値の十分な信頼性を得ることができたと考えられた。

LC-MS/MS を用いた経口分子標的薬の測定系の多くは、標的化合物の安定同位体を内部標準物質として用いている [85–88]。しかし、安定同位体を用いた場合、測定薬物と同数の安定同位体が必要となり、一斉分析系はランニングコスト面から、臨床現場への適用には不向きとなる。また、内部標準物質を選択する基準として、生体内などの実試料に含まれない成分で、かつ標的化合物と化学的・物理的特性が類似することが重要である。今回内部標準物質として用いたロス

コビチンは、本邦では医薬品として承認されていないサイクリン依存性キナーゼ阻害剤である[89,90]。体内で産生されることもないことから、経口分子標的薬の一斉測定系における内部標準物質として適当であると考えた。マトリックスファクター（Table 8）および回収率（Table 9）の検討結果からも、ロスコビチンは経口分子標的薬の一斉測定系の内部標準物質として問題なく使用できることが確認された。

全血を試料とした免疫抑制薬の同時分析系における平均マトリックスファクターは 30% 程度（Table 10）であったことからマトリックスによるサプレッションが生じていることが示唆された。さらにタクロリムスおよびエベロリムスにおいてマトリックスファクターの C.V.% が単独では 15% を超えたことから適切な内部標準物質を用いた測定法の開発が必要と考えられた。これまでアスコマイシンを内部標準物質としてタクロリムスを測定した報告[91]がなされている。アスコマイシンはタクロリムスの C21 エチル類似体でありタクロリムスと同様の作用機序で免疫抑制能をもつ化合物である[92]が、医薬品として上市されていない。以上より免疫抑制薬の同時分析系の内標準物質として適切と考えられた。内部標準物質としてアスコマイシンを用いて補正することで、タクロリムスのマトリックスファクターの C.V.% は 15% 以内となったが、エベロリムスの C.V.% が 15% を上回る結果となった。エベロリムスに関しては適切な内部標準物質の再検討を必要性が生じたため、重水素で標識した安定同位体標識化合物であるエベロリムス-d4 を用いることとした。その結果、マトリックスファクターの C.V.% は 15% 以内となり、許容基準を満たした。

免疫抑制薬 2 種類の平均回収率は 40% 程度であり（Table 11）、前処理の方法を修正することにより、さらに回収率を向上させることは可能と思われる。一方で、回収率の C.V.% は内部標準物質で補正する前・補正した後いずれも 15%

以内であったことから、今回構築した前処理方法は、回収率がマトリックスの影響を受けない固相抽出法であることが示された。

安定性について検討した結果、オシメルチニブは著しく安定性が悪く、室温で 6 時間保存した場合には薬物濃度が理論値の約 40% まで低下した（Table 12）。これは、オシメルチニブが血漿蛋白と不可逆的な共有結合を形成することが要因と考えられる [93]。共有結合は強固な結合形式である。種々の有機溶媒での前処理や酸・塩基添加による前処理を検討したが、蛋白結合した薬物の回収は不可能であった（データ未収載）。よって、安定性の保証期間内に迅速に測定を実施することで、測定値の信頼性を保証した。

以上より、生体試料を対象とした経口分子標的薬の一斉分析系および免疫抑制薬の同時分析系は、全ての薬物において良好な直線性・再現性・選択性を示した。また、今回検証した保管条件下で生体試料を保管することで、薬物血中濃度を正確に定量することが可能であることが示された。

第五節 小括

第一章では LC-MS/MS を用いて 12 種類の経口分子標的薬（アファチニブ、アレクチニブ、クリゾチニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、レンバチニブ、ニロチニブ、オシメルチニブ、ポナチニブ、ソラフェニブ）ならびに 2 種類の免疫抑制薬（タクロリムス、エベロリムス）の生体試料における一斉分析系の構築を行った。

その結果、経口分子標的薬においては、1 アッセイ 7 分という短時間での測定に加え、1 種類のみの内部標準物質を用いた内標準法にて血漿中の全薬物が測定できることが示された。前処理法も蛋白沈殿法を用いた簡易なものであることから、12 種類の経口分子標的薬を同時に迅速かつ効率的に測定することが可能となった。

免疫抑制薬においては、1 アッセイ 5 分という短時間での測定を可能とした。全血中においてはタクロリムスとエベロリムスの 2 種類を同時に測定できることが示された。

本章にて構築した 2 つの分析系は FDA の提示するガイドラインに準じてバリデーションを行っており、測定値の信頼性が十分に保証されているものである。

以上より、今回構築した経口分子標的薬ならびに免疫抑制薬の一斉分析系は、薬物治療における薬物血中濃度モニタリングを可能とするばかりでなく、体内動態の個人差が大きい免疫抑制薬と整腸剤や発酵食品由来の微生物との相互作用を切り口とした体内動態の個人差解明に関する研究を進めていくにあたり、基盤となることが示された。

第二章 医薬品－微生物間相互作用の *in vitro* スクリーニングと消失機構の解明

第一節 序論

ここ数年、腸内細菌叢が疾患に関係していることが相次いで報告され、その重要性が広く認識されている。腸内細菌叢を整える方法として、身体に良い菌（善玉菌）を食品などの形で直接摂取する（プロバイオティクス）、もしくは腸内の善玉菌の栄養源となるものを摂取すること（プレバイオティクス）が良いとされている。前者の例として発酵食品や整腸剤、後者の例として食物繊維やオリゴ糖が代表的なものとして知られている[10,94]。腸内細菌叢を整えることで消化管の運動性の向上[95]、免疫機能の調整[10,12]、アレルギーなどの炎症性疾患の予防[13]、動脈硬化の予防[96,97]が期待される。

プロバイオティクスの認知度はグローバルに拡大し続けており、2020 年に米国で行われた調査結果では、健康改善のため 25% の国民がプロバイオティクスを行っていると報告[15]された。また、その市場も 2011 年に世界全体で推定 250 億米ドル規模だったのに対して 2020 年には推定 500 億米ドルを超える規模となる成長を遂げている[14]。このような自身の健康の保持増進を目的とした整腸剤および発酵食品の摂取頻度の増加はその有益性のみが評価されがちであるが、これらの日常的な摂取にマイナスの側面がないとは言い切れない。

その一例として、整腸剤や発酵食品由来の微生物が医薬品を代謝する可能性が挙げられる。ヒト腸内細菌叢に由来する細菌株による医薬品の代謝活性スクリーニングを行った結果、これまでに考えられていた以上に多くの医薬品が微生物によって分解される可能性があるという Zimmermann らによる報告[16]をは

じめとして、腸内細菌のもつ代謝能が医薬品の体内動態に関与する可能性があるとの意見が散見される[98,99]。これまでに報告された腸内細菌による医薬品代謝への影響に関する研究のほとんどが糞便中の細菌を用いる *ex vivo* 系で行われている[17]。しかしながら医薬品の吸収部位となる小腸上部と糞便中では構成細菌の種類や細菌数が大きく異なる[18]ことから、糞便を用いた評価は実際の生体内での反応と乖離している可能性がある。一方、整腸剤および発酵食品には数億を超える微生物が含まれており、Takada らの報告によるとその約 8% が回腸付近でも生残すると報告[19]されている。そのため、発酵食品および整腸剤由来の微生物は生きたまま腸管に到達することに加え、医薬品と同時に摂取することが多いことから、医薬品に対するこれらの微生物の影響が無視できない可能性が推察されるが、これを明らかにした研究はこれまで報告されていない。

移植後免疫抑制療法に用いられる免疫抑制薬であるタクロリムス、シクロスポリン A およびエベロリムス、抗悪性腫瘍薬治療に用いられる経口分子標的薬は薬物動態の個人差が大きいため、血中薬物濃度モニタリングに基づく投与設計が有用とされている[42,43,46,58–60]。近年、個人の腸内細菌叢の違いがタクロリムスの必要投与量と関連する[100]ことや、腸内細菌叢由来の細菌がタクロリムスを分解することが報告[101]され、発酵食品および整腸剤由来の微生物も同様に免疫抑制薬に対する影響を有する可能性がある。また、抗悪性腫瘍薬と腸内細菌との関連については以前より報告されているイリノテカン、ゲムシタビンや白金製剤に関する報告[6,7,102,103]があり、経口分子標的薬も細菌による影響を受ける可能性があるものと推察される。したがって、発酵食品および整腸剤由来の微生物とこれらの医薬品との相互作用に関する情報は非常に有用性の高い情報となりうる。

そこで第二章では、整腸剤および発酵食品から単離した経口摂取可能な細菌が免疫抑制薬であるタクロリムス、エベロリムス、シクロスポリンAおよび経口分子標的薬であるゲフィチニブ、エルロチニブ、オシメルチニブ、アレクチニブ、イマチニブの体内動態に与える影響についてスクリーニングを行い、培養後に医薬品の消失が見られた組み合わせについて、その消失機構の解明を目指した。

第二節 方法

試薬

測定に使用したエルロチニブ、ゲフィチニブ、タクロリムス、エベロリムス シクロスポリン A およびイマチニブメタンスルホン酸塩は LC Laboratories Co.（MA, USA）から購入した。アレクチニブは Active Biochem Ltd.（NJ, USA）から購入した。オシメルチニブは Cayman Chemical Co.（MI, USA）から購入した。ロスコビチン、アスコマイシン、レボフロキサシン、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ギ酸（特級）およびグリセリン（特級）は富士フィルム和光純薬株式会社（Osaka, Japan）から購入した。メタノール（HPLC 用）およびギ酸アンモニウム（特級）はナカライテスク株式会社（Kyoto, Japan）から購入した。超純水は、Elga LaboWater PURELAB flex syste（High Wycombe, UK）で精製したものを用いた。タクロリムスのヒトにおける主要代謝産物である 13-*O*-Desmethyl tacrolimus（M-I）、31-*O*-Desmethyl tacrolimus（M-II）および 15-*O*-Desmethyl tacrolimus（M-III）はアステラス製薬（Tokyo, Japan）より譲りうけた。Thomson 0.22 μm PVDF フィルターバイアルは THOMSON（CA, USA）から購入した。300 μL ポリプロピレンバイアルは Waters（MA, USA）より購入した。0.22 μm PVDF フィルターおよび 0.22 μm PTFE フィルターは Merck（Darmstadt, Germany）より購入した。BHI 液体培地および BHI 寒天培地は日水製薬株式会社（Tokyo, Japan）から購入した。

解析対象微生物の選定

整腸剤については、2021 年時点で九州大学病院にて処方されている医療用活性生菌製剤を選択した。また、発酵食品については、スーパーマーケットまた

はコンビニエンスストアで簡単に入手できる商品を中心に、広く流通している商品を選択し、それぞれから微生物を単離、培養、解析した。整腸剤として医療用医薬品であるミヤ BM®（ミヤリサン製薬株式会社)、ラックビー®（興和株式会社)、ビオフェルミン®（ビオフェルミン製薬株式会社)、ビオフェルミン R®（ビオフェルミン製薬株式会社)、ビオスリー®（東亜薬品工業株式会社）を選定した。また発酵飲食品としてお城納豆（丸美屋)、明治プロビオヨーグルト LG21（株式会社明治)、雪印メグミルクヨーグルト megumi（雪印メグミルク株式会社)、明治プロビオヨーグルト R-1（株式会社明治)、ダノンビオヨーグルト（ダノンジャパン株式会社)、ヤクルト（株式会社ヤクルト本社)、ピルクル（日清食品ホールディングス株式会社）を選定した。

微生物の単離と培養条件

整腸剤及び発酵飲食品を生理食塩水で懸濁し、BHI 寒天培地に画線した。37°C で 1～2 日間培養後に得られた単コロニーをさらに BHI 液体培地で培養し、培養液に終濃度 12.5% のグリセリンを添加して、使用まで-80°C で保存した。好気性菌は静置あるいは振とう培養し、嫌気性菌は 2 日間嫌気化した培地を用いて、嫌気ジャー内で培養を行った。医療用医薬品であるミヤ BM®より *Clostridium butyricum*、ラックビー®より *Bifidobacterium longum*、ビオフェルミンより *Bifidobacterium bifidum*、ビオフェルミン R®より *Enterococcus faecalis*、ビオスリー®より *Clostridium butyricum*、*Enterococcus faecium* および *Bacillus subtilis TO-A* をそれぞれ単離した。また発酵飲食品である丸美屋お城納豆より *Bacillus subtilis Natto*、明治プロビオヨーグルト R-1 より *Lactobacillus bulgaricus OLL1073R-1*、ダノンビオヨーグルトより *Bifidobacterium lactis CNCM I-2494* を、乳酸菌飲料であるヤクルトより *Lactobacillus casei YIT 9029*、ピルクルより *Lactobacillus casei*

NY1301 をそれぞれ単離した。*Bacillus subtilis 168* はナショナルバイオリソースプロジェクトより、*Bacillus subtilis 3610* は独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターより譲りうけた。単離した細菌と培養条件のリストを Table 14 に示す。

薬液の調整

アレクチニブを除くすべての薬物は 5 mg/mL となるように DMSO で溶解して一次ストック溶液を作成した。アレクチニブは、溶媒全般への溶解度が低いため、1 mg/mL となるように DMSO で溶解して一次ストック溶液を作成した。一次ストック溶液を DMSO で希釈し、培地に添加する薬液として 100 μg/mL の溶液を作成した。

培養培地のサンプリング

BHI 培地を 1980 μL に 100 μg/mL の薬液 20 μL を添加し、各細菌株の一晩培養液 10 μL を加えて、37°C で 24 時間培養したものを培養後培地試料とした。また、薬物は含むが細菌の接種は行わずに 37°C で 24 時間培養したものをネガティブコントロールとした。薬物を含まない BHI 培地に各細菌株の一晩培養液 10 μL を加えて 37°C で 24 時間培養したものをブランク試料とした。好気性細菌は振とう培養し、嫌気性細菌は 2 日間嫌気化した培地を用いて嫌気ジャー内で培養した。嫌気培養の場合、培地への酸素の混入を避けるため薬物は嫌気化前の培地に添加し、自然分解を避けるために 20°C で嫌気化した。その後 24 時間培養を行い、培養液と等量のメタノールを加えて、ボルテックスをした。遠心（20,400 *g*、10 分、25°C）を行い、得られた上清を 0.22 μm PVDF フィルターで濾過滅菌し、培地内薬物濃度測定まで-80°C で保存した。

Table 14 The list of isolated bacterium and culture conditions

Culture condition	strain	Brand name
Anaerobic	*Clostridium butyricum*	Miya-BM®
Anaerobic	*Bifidobacterium longum*	LAC-B®
Anaerobic	*Bifidobacterium bifidum*	Biofermin®
Anaerobic / Aerobic	*Enterococcus faecalis*	Biofermin-R®
Anaerobic	*Clostridium butyricum*	Bio-three®
Anaerobic	*Enterococcus faecium*	Bio-three®
Anaerobic / Aerobic	*Lactobacillus casei YIT 9029*	Yakult
Anaerobic / Aerobic	*Lactobacillus casei NY1301*	Pirkul 400
Anaerobic	*Lactobacillus bulgaricus OLL1073R-1*	R-1 yogurt
Anaerobic	*Bifidobacterium lactis CNCM I-2494*	Danone yogurt
Aerobic	*Bacillus subtilis TO-A*	Bio-three®
Aerobic	*Bacillus subtilis 168*	Provided by NBRP
Aerobic	*Bacillus subtilis 3610*	Provided by NBRC
Aerobic	*Bacillus subtilis Natto*	Oshiro natto

NBRP, National bioresource project; NBRC, National institute of technology and evaluation biological resource center.

培養液と菌体成分の画分の調整

新鮮な BHI 培地 1.5 mL に各細菌株の一晩培養液を 7.5 µL 接種して 24 時間振とう培養した。1.2 mL の培養液を 1.5 mL マイクロチューブに移し、Biroruptor で超音波破砕処理（30 秒 on、30 秒 off、4 サイクル、氷上）し、WCL とした。1.2 mL の培養液を 1.5 mL マイクロチューブに移して遠心（20,400 *g*、10 分、4°C）し、得られた上清を 0.22 µm PVDF フィルターで滅菌した。これを Sup とした。Sup 回収後に得られたペレットを氷冷 BHI 培地で 1 回洗浄し、1.2 mL の氷冷 BHI 培地で再懸濁し、Biroruptor で超音波破砕処理（30 秒 on、30 秒 off、4 サイクル、氷上）した。遠心（20,400 *g*、10 分、4°C）し、得られた上清を 0.22 µm PVDF フィルターで滅菌した。これを CL とした。CL 回収後に得られたペレットを氷冷 BHI 培地で 1 回洗浄し、1.2 mL の氷冷 BHI 培地で再懸濁した。これを Deb とした。各画分のイメージ図を Figure 5 に示す。Sup には菌体外に分泌された蛋白質が、CL には細胞質やリボソームなどの菌体内の成分が含まれる。Deb は細胞壁や莢膜、鞭毛、膜蛋白などの菌体の不溶性成分を含み、Deb、Sup、CL のすべてを含む画分を WCL とした。

画分別培養培地のサンプリング

作成した画分内で細菌が仮に生存している際の影響を考慮してレボフロキサシンを BHI 培地に添加した。BHI 培地を 1960 µL に 100 µg/mL の薬液 40 µL を添加し、2 µg/mL の薬物を含む培地を作成した。750 µL の薬物を含む BHI 培地に、等量の各画分を添加し、37°C で 24 時間培養した。24 時間後、培養液と等量のメタノールを加えて、ボルテックスした。遠心（20,400 *g*、10 分、25°C）を行い、得られた上清を 0.22 µm PVDF フィルターで濾過滅菌し、培地内薬物濃度測定まで-80°C で保存した。

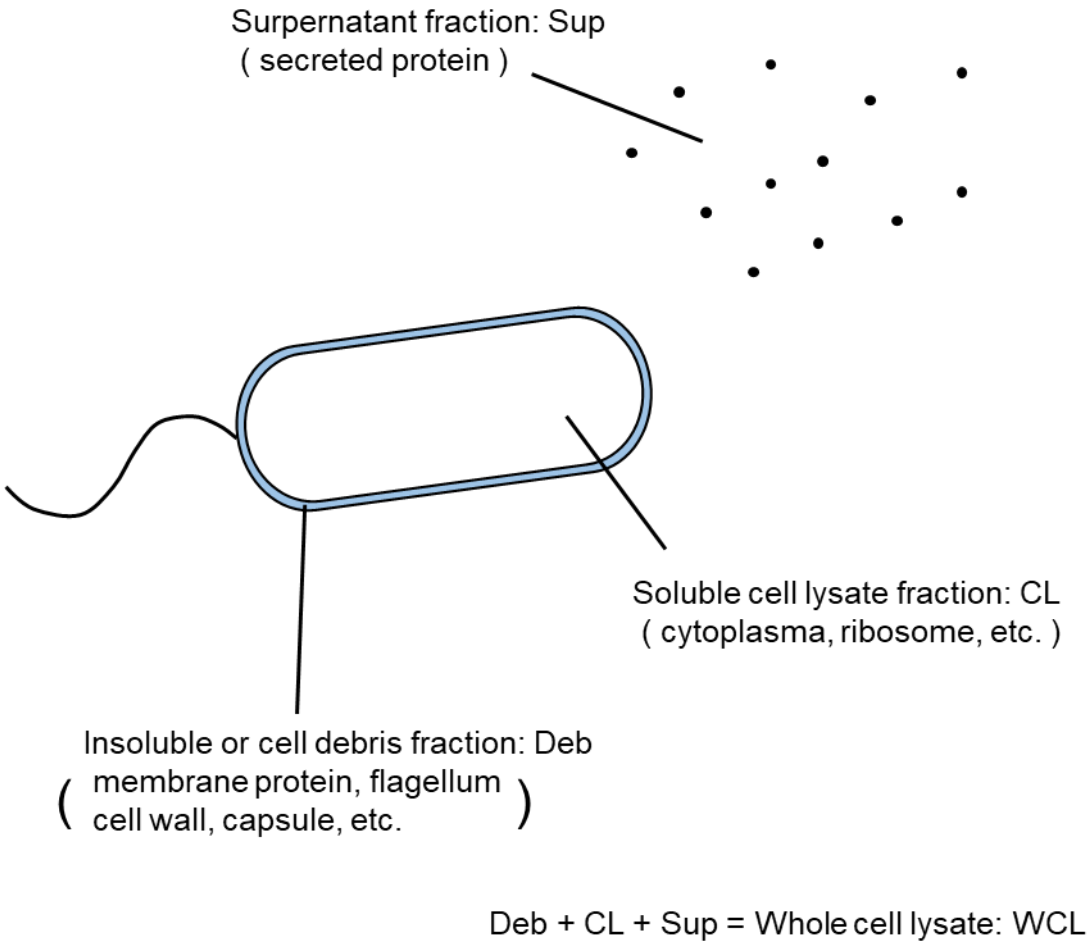


Figure 5 The image of bacterial fraction

培養培地での経口分子標的薬の測定

アレクチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、オシメルチニブ、イマチニブの一次ストック溶液を DMSO で希釈し 1、2、5、10、20、50、100、200 μg/mL 検量線用溶液を作成した。BHI 培地 99 μL に 1 μL の検量線用溶液を添加し、メタノール 100 μL を加えてボルテックスした。遠心（20,400 *g*、10 分、25°C）を行い、得られた上清を 0.22 μm PVDF フィルターで濾過して検量線用試料を作成した。作成した検量線用試料および培養後培地試料 50 μL に 950 μL のメタノールを加え、ボルテックスした。遠心（15,000 *g*、5 分、25°C）を行い、得られ

た上清を Thomson 0.22 μm PVDF フィルターバイアルに移し、フィルター濾過した試料 1 μL を分析に供じた。定量は液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（LC-MS/MS）を用いて行い、装置条件は第一章に準じた。

培養培地での免疫抑制薬測定

タクロリムス、エベロリムスおよびシクロスポリン A の一次ストック溶液を DMSO でさらに希釈し 1、2、5、10、20、50、100、200 μg/mL の検量線用溶液を作成した。BHI 培地 99 μL に 1 μL の検量線用溶液を添加したのち、メタノール 100 μL を加えてボルテックスした。遠心（20,400 *g*、10 分、25°C）を行い、得られた上清を 0.22 μm PVDF フィルターで濾過して検量線用試料を作成した。作成した検量線用試料および培養後培地試料 50 μL に対して 950 μL のメタノールを加え、ボルテックスした。遠心（15,000 *g*、5 分、25°C）を行い、得られた上清を Thomson 0.22 μm PVDF フィルターバイアルに移し、フィルター濾過した試料 1 μL を分析に供じた。定量は LC-MS/MS を用いて行い、装置条件は第一章を一部改変し、シクロスポリンの定量トランジションは 1203 > 156 に設定した。

標品を用いたタクロリムス代謝産物の定性

水 : メタノール =1 : 1（v / v）で作成したタクロリムスヒト主要代謝産物 13-*O*-Desmethyl tacrolimus（M-I）、15-*O*-Desmethyl tacrolimus（M-II）および 31-*O*-Desmethyl tacrolimus（M-III）の標品溶液（20 μg/mL）を DMSO で希釈し、1 μg/mL の希釈溶液を作成した。希釈した 1 μg/mL の溶液 2 μL に BHI 培地 198 μL を加えて、さらにメタノール 200 μL を加えてボルテックスした。遠心（20,400 *g*、10 分、25°C）を行い、得られた上清を 0.22 μm PVDF フィルターで濾過して標品試料とした。標品試料と -80°C で保存しておいた培養後培地試料およびネガ

ティブコントロール 300 μL をそれぞれ、Waters（MA, USA）の HLB μElution Plate に負荷し、次いで超純水 600 μL で固相を洗浄した。窒素ガスを吹きかけて固相を乾燥させたのちに 50 μL のメタノールで固相から抽出を行い、300 μL ポリプロピレンバイアルに移したのち、2 μL を分析に供じた。

測定機器は液体クロマトグラフの送液ポンプは島津製作所（Kyoto, Japan）の Nexera X2 LC-30AD を、カラムオーブンは同社の CTO-20AC、オートサンプラーは同社の Nexera X2 SIL-30AC を使用し、同社の質量分析計 LCMS-8050^{TM} と組み合わせた LC-MS/MS で定性を行った。カラムは Phenomenex （CA, USA）の Kinetex Core-Shell C8 column（2.1 × 150 mm、2.6 μm）を使用し、移動相 A は 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液を、移動相 B は 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸メタノール溶液を使用してグラジエント分析を行った。流速は 0.4 mL/分とし、初期溶媒は移動相 B を 50% とし、0.1 分間 50% で維持したのち 0.9 分かけて移動相 B を 60% 、続いて 5 分間かけて移動相 B を 70% 、2 分間かけて移動相 B を 100% へと変化させた。3 分間移動相 B を 100% で維持したのち初期溶媒に戻して再平衡化を行い、1 サイクル 15 分で分析を行った。オートサンプラーの温度は 4°C、カラムオーブンの温度は 40°C に設定した。質量分析計のネブライザーガス、ドライングガス、ヒーティングガスはそれぞれ 3 L/分、10 L/分、10 L/分とした。インターフェイス温度、脱溶媒温度、ヒートブロック温度、インターフェイス電圧はそれぞれ 300°C、250°C、および 400°C とし、ESI ポジティブモードで検出を行った。各代謝物のトランジションを Table 15 に示す。

Table 15 Monitored transitions, collision voltages and retention times of tacrolimus metabolites

Drug Name	Mode	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	CV (V)	Retention Time (min)
13-O-Desmethyl tacrolimus $[M+Na]^+$	Quantitative	813.0	603.0	-35	4.804 and 5.784
	Qualitative	813.0	346.0	-55	
15-O-Desmethyl tacrolimus $[M+Na]^+$	Quantitative	813.0	612.0	-45	7.428
	Qualitative	813.0	416.0	-55	
31-O-Desmethyl tacrolimus $[M+Na]^+$	Quantitative	813.0	603.0	-35	6.524
	Qualitative	813.0	474.0	-45	

min, minutes; CV, Collision Voltage.

スキャンモードを用いた代謝物の探索

-80°C で保存しておいた培養後培地試料、ネガティブコントロールおよびブランク試料 50 µL に対してメタノール 200 µL を加えて、ボルテックスした。遠心（20,400 *g*、10 分、25°C）を行い、得られた上清を 0.22 µm PTFE フィルターで濾過し、300 µL ポリプロピレンバイアルに移したのち、2 µL を分析に供じた。

測定機器は液体クロマトグラフの送液ポンプは島津製作所（Kyoto, Japan）の Nexera X2 LC-30AD を、カラムオーブンは同社の CTO-20AC、オートサンプラーは同社の Nexera X2 SIL-30AC を使用し、同社の質量分析計 LCMS-8050™ と組み合わせた LC-MS/MS により定性を行った。カラムは Phenomenex（CA, USA）の Kinetex Core-Shell C8 column（2.1 × 150 mm、2.6 µm）を使用し、移動相 A は 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液を、移動相 B は 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸メタノール溶液を使用してグラジエント分析を行った。流速

は 0.4 mL/分とし、初期溶媒は移動相 B を 5% とし、1 分間 5% で維持したのち 19 分かけて移動相 B を 100% へと変化させた。5 分間移動相 B を 100% で維持したのち 1 分かけて初期溶媒に戻して再平衡化を行い、1 サイクル 30 分で分析を行った。オートサンプラーの温度は 4°C、カラムオーブンの温度は 40°C に設定した。質量分析計のネブライザーガス、ドライングガス、ヒーティングガスはそれぞれ 3 L/分、10 L/分、10 L/分とした。インターフェイス温度、脱溶媒温度、ヒートブロック温度、インターフェイス電圧はそれぞれ 300°C、250°C、および 400°C とし、ESI ポジティブモードで CID ガスは供給せずに Q3 スキャンを行った。

統計処理

統計ソフトは EZR を使用して行った [104]。3 群以上の平均値の比較は Dunnett 検定により実施した。統計的有意水準は $p < 0.05$ とした。

第三節 結果

細菌培養が薬物残存に及ぼす影響についての *in vitro* スクリーニング

細菌による医薬品の代謝実験はこれまで報告[99]のある評価系を一部改変して評価した。薬物と細菌とのインキュベート時間については先行研究[99]に準じて24時間に設定した。細菌による代謝活性 *in vitro* スクリーニングのうち、経口分子標的薬であるオシメルチニブ、アレクチニブ、イマチニブ、ゲフィチニブおよびエルロチニブの結果を Figure 6 に示す。細菌を接種していない培地の残存薬物濃度を100% とし、細菌接種後24時間の薬物残存率を求めて評価した。培養は嫌気性条件または好気性条件のいずれかのうち、Table 14 に従い、それぞれの細菌に適切な条件で行った。エルロチニブは細菌存在下も薬物残存率に変化は見られなかった。アレクチニブ、イマチニブ、ゲフィチニブは *Bacillus subtilis TO-A* との培養で 10% 程度薬物残存率の低下が見られた。オシメルチニブは *Bacillus subtilis TO-A* との培養で 35% 程度薬物残存率の低下が見られた。*Bacillus subtilis TO-A* を除く細菌株ではアレクチニブ、イマチニブ、ゲフィチニブの薬物残存率に変化は見られなかった。

以上より、経口分子標的薬の中でオシメルチニブは *Bacillus subtilis TO-A* の影響で培地中薬物の消失が生じることが示された。

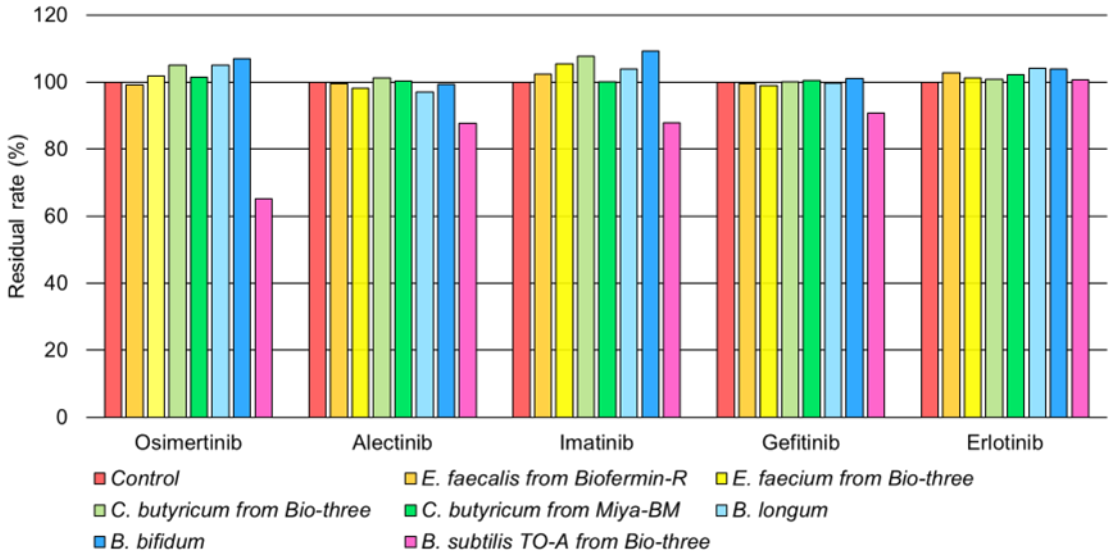


Figure 6 *In vitro* screening to evaluate interactions between oral molecular-targeted drugs and bacteria (n = 1)

E. faecalis, *Enterococcus faecalis*; *E. faecium*, *Enterococcus faecium*; *C. butyricum*, *Clostridium butyricum*; *B. longum*, *Bifidobacterium longum*; *B. bifidum*, *Bifidobacterium bifidum*; *B. subtilis TO-A*, *Bacillus subtilis TO-A*.

細菌による代謝活性 *in vitro* スクリーニングのうち、免疫抑制薬 3 種類を、嫌気性条件（a）と好気性条件（b）に分けた結果を Figure 7 に示す。培養は Table 14 に従い、嫌気性条件または好気性条件のいずれか適切な条件で行った。今回対象としたすべての細菌株でシクロスポリン A およびエベロリムスの残存率は軽度に低下した（$p < 0.001$）。タクロリムスは、*Clostridium butyricum* 存在下で残存率が 70% まで軽度に低下し、*Bacillus subtilis TO-A* 存在下では残存率は 17%まで大幅に低下した（$p < 0.001$）。一方で、他の細菌株では残存率の変化は見られなかった。エベロリムスも同様の傾向が見られ、*Clostridium butyricum* および *Bacillus subtilis TO-A* 存在下で顕著に残存率の低下がみられ、それぞれ 76% 、21% まで低下した。

以上より、タクロリムスおよびエベロリムスは *Clostridium butyricum* と *Bacillus subtilis TO-A* の影響で培地中薬物濃度の大きな低下を見せ、特に *Bacillus subtilis TO-A* は大幅に残存率を低下させることが示された（$p < 0.001$）。

(a) Aero condition

(b) Anaero condition

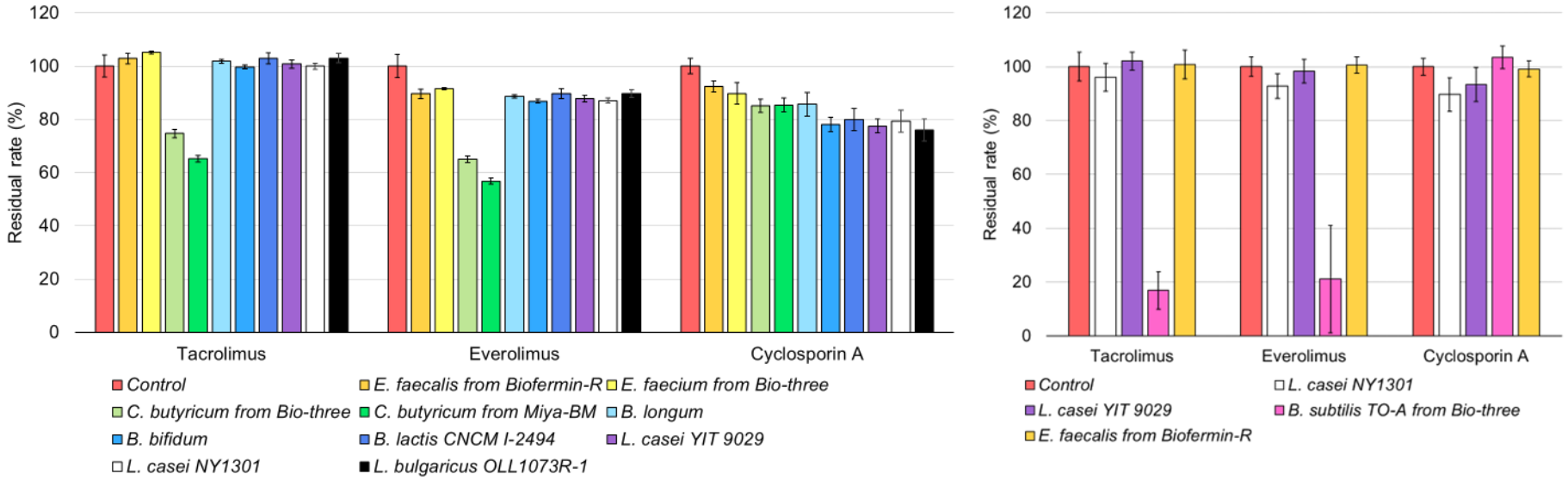


Figure 7 *In vitro* screening to evaluate interactions between immunosuppressant drugs and bacteria (n = 3)

E. faecalis, *Enterococcus faecalis*; *E. faecium*, *Enterococcus faecium*; *C. butyricum*, *Clostridium butyricum*; *B. longum*, *Bifidobacterium longum*; *B. bifidum*, *Bifidobacterium bifidum*; *B. lactis*, *Bifidobacterium lactis*; *L. casei*, *Lactobacillus casei*; *L. bulgaricus*, *Lactobacillus bulgaricus*; *B. subtilis TO-A*, *Bacillus subtilis TO-A*.

Bacillus subtilis が免疫抑制薬の残存に及ぼす影響

培養後のタクロリムスおよびエベロリムスの薬物残存率を大幅に低下させた *Bacillus subtilis TO-A* に着目し、標準株である *Bacillus subtilis 168* と別の株である *Bacillus subtilis natto* および *Bacillus subtilis 3610* についても *in vitro* スクリーニングを行った。培養はすべて好気性条件下で行った。細菌接種後 24 時間の薬物残存率を Figure 8 に示す。培養後の薬物残存率はタクロリムスが *Bacillus subtilis 168* で 7% 、*Bacillus subtilis natto* で 10% 、*Bacillus subtilis 3610* で 5% に低下した。同様にエベロリムスも 10% 、30% 、9% にそれぞれ低下した。Dunnett 検定の結果、細菌を接種していない培地に対してほかの *Bacillus subtilis* 株も有意に薬物残存率を低下させた（$p < 0.001$）。

以上より、今回検討した *Bacillus subtilis* 4 種はどの細菌株もタクロリムスおよびエベロリムスも有意に薬物残存率を低下させることが示された。

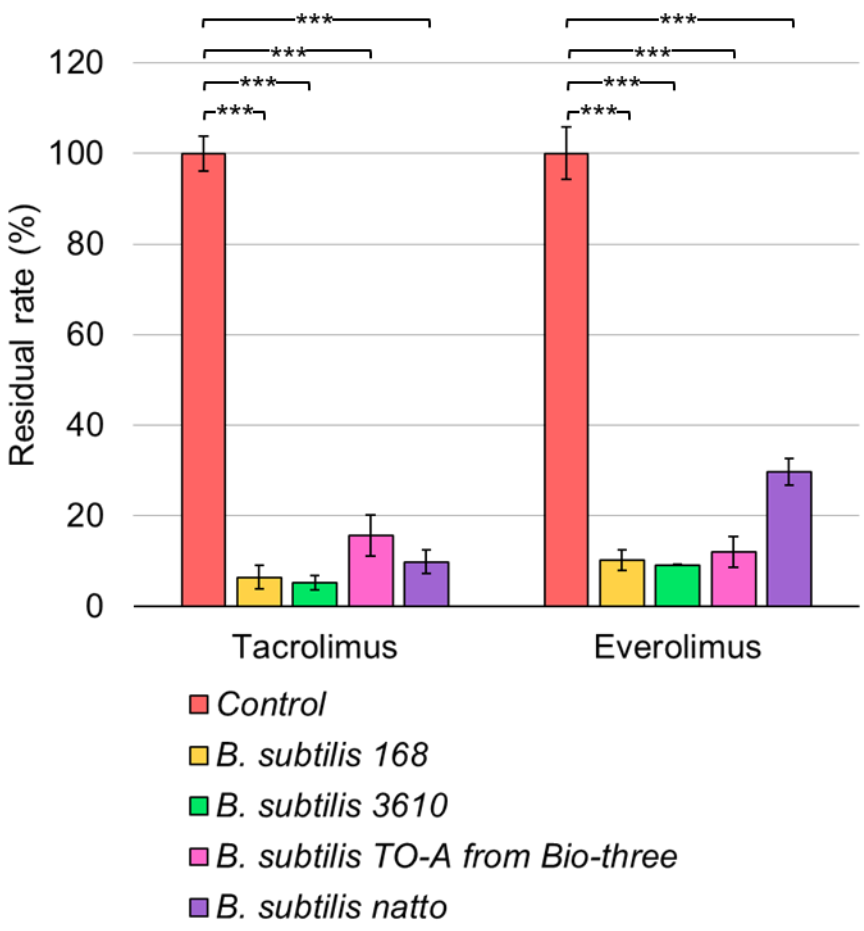


Figure 8 Effect of Bacillus species on the residual rate of tacrolimus and everolimus (n = 3)

B. subtilis, *Bacillus subtilis*.

*** $p < 0.001$

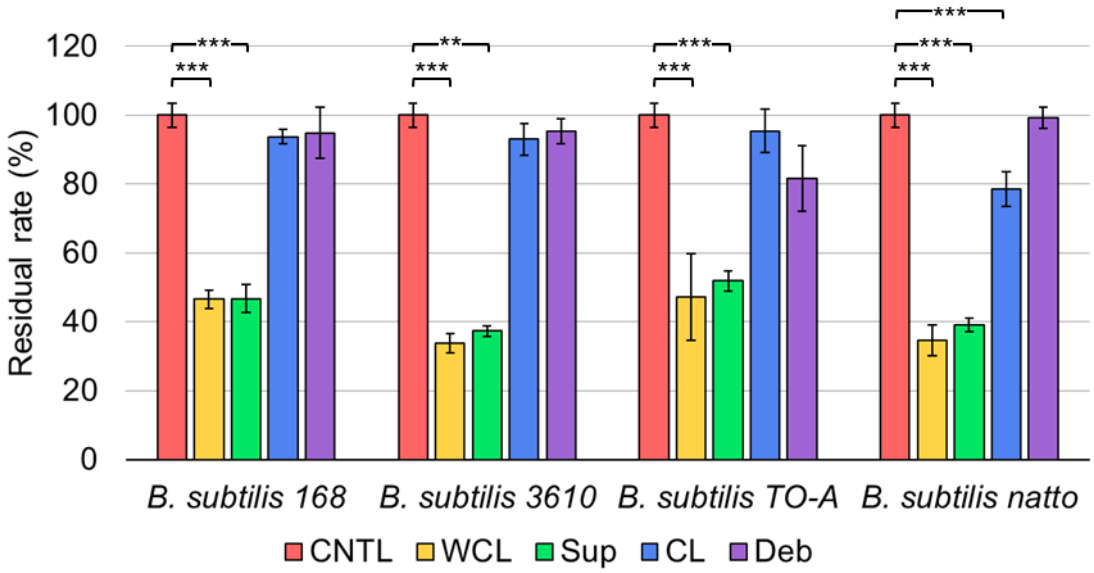
菌体の画分を用いた薬物消失機構の解明

菌体内外いずれの成分が薬物の消失に関与するのかを探索するため、菌体外に分泌された蛋白質が含まれる培養上清画分（Sup）、菌体内の成分を含む溶菌液画分（CL）、細胞膜や膜蛋白などの不溶性成分を含む破砕片画分（Deb）とこれらすべてを含む溶菌液全体（WCL）に分画し、薬物を含む培地にそれぞれの画分を添加して薬物残存率の変化を確認した。なお、画分を添加していない培地（CNTL）の薬物残存濃度を 100% とし、薬物残存率を計算した。

各画分添加後 24 時間のタクロリムス（a）とエベロリムス（b）の残存率を Figure 9 に示す。*Bacillus subtilis 168*、*Bacillus subtilis 3610*、*Bacillus subtilis TO-A*、*Bacillus subtilis Natto* の WCL を添加時のタクロリムス残存率はそれぞれ 47% 、34% 、47% 、35% であり、Sup を添加時のタクロリムス残存率はそれぞれ 47% 、37% 、52% 、39% であった。また WCL を添加時のエベロリムス残存率はそれぞれ 23% 、35% 、19% 、42% であり、Sup を添加時のエベロリムス残存率はそれぞれ 33% 、36% 、39% 、31% であった。

以上より、WCL と Sup は培地中薬物を同程度消失させたことから培地中の薬物の消失に関与する因子は主に Sup に含まれる因子であったことが示唆された。また一部の Deb、CL でも、画分を含まない培地に比較して有意に薬物残存率の低下が見られたことから複数の因子が薬物の消失に関与していること、および細胞株の違いで薬物消失に関与している因子の寄与率が異なることが示唆された。

(a) Tacrolimus



(b) Everolimus

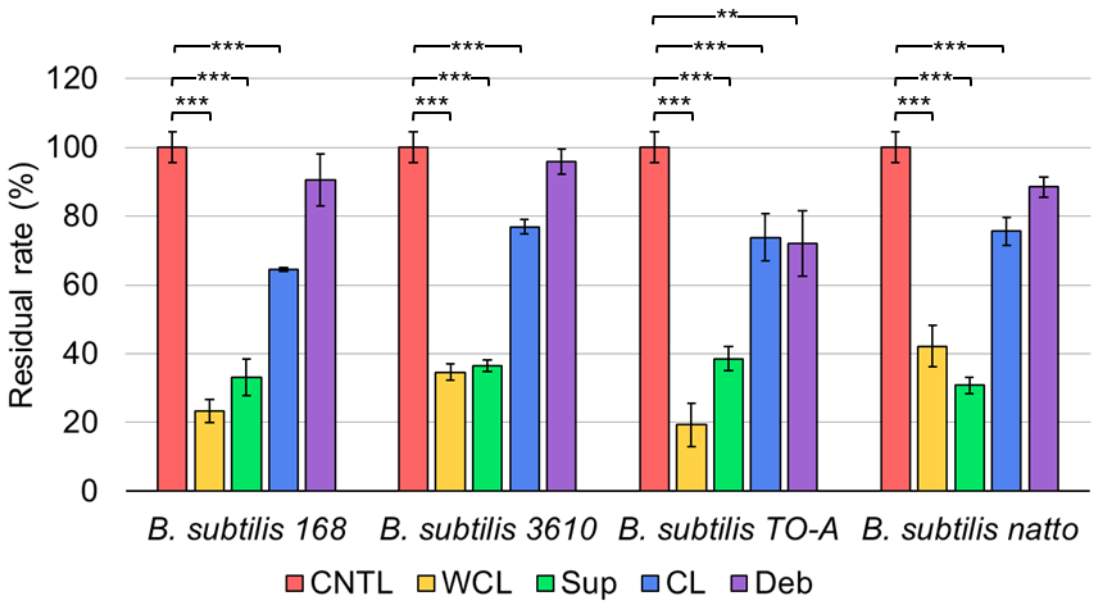


Figure 9 Effect of bacterial fraction on residual rate of tacrolimus and everolimus (n = 3)

CNTL, control; WCL, whole cell lysate; Sup, supernatant fraction; CL, soluble cell lysate fraction; Deb, insoluble or cell debris fraction; *B. subtilis*, *Bacillus subtilis*.

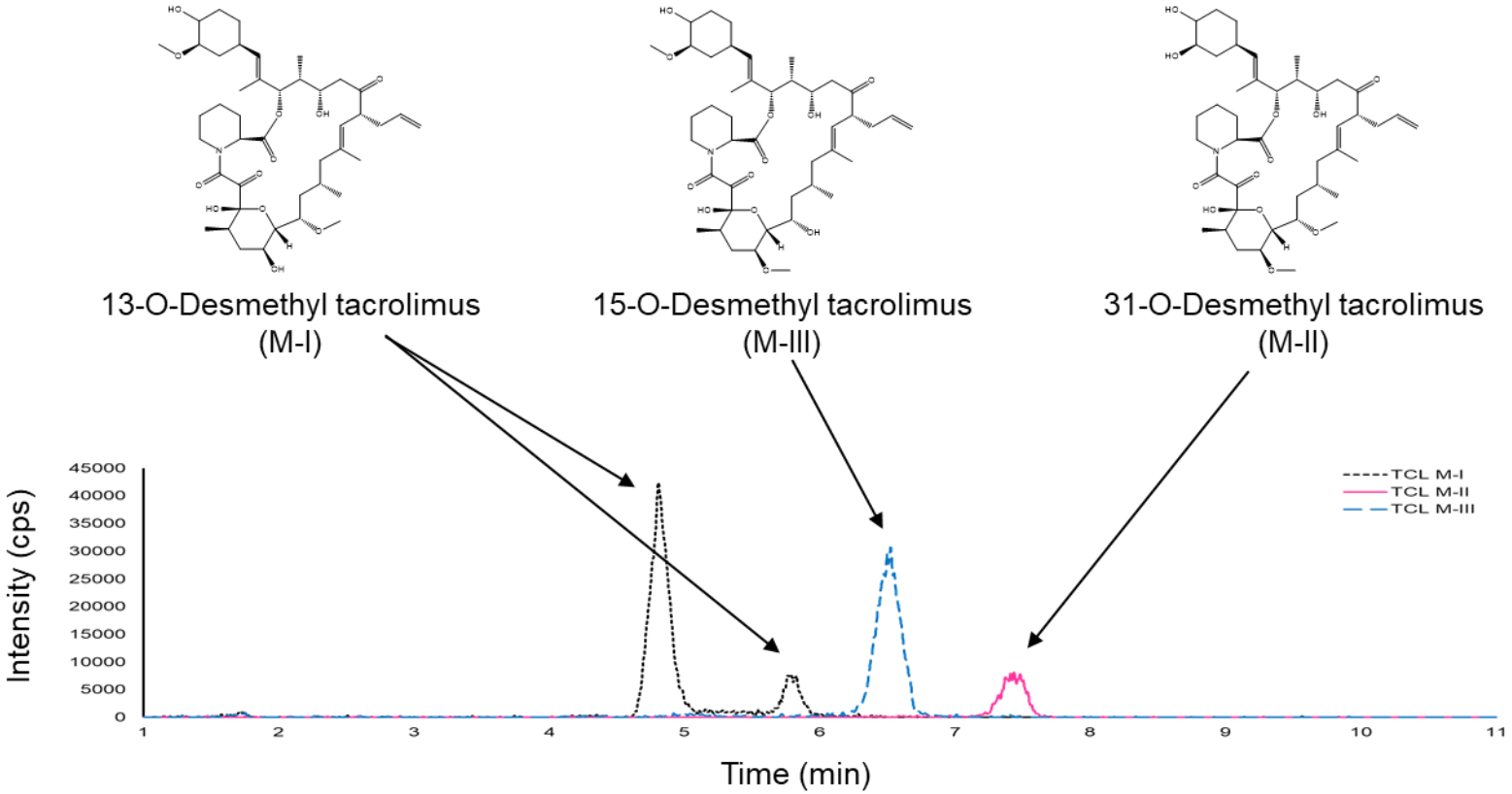
*** $p < 0.001$, ** $p < 0.05$.

ヒトにおけるタクロリムスの主要代謝産物の標品を用いた代謝産物の推定

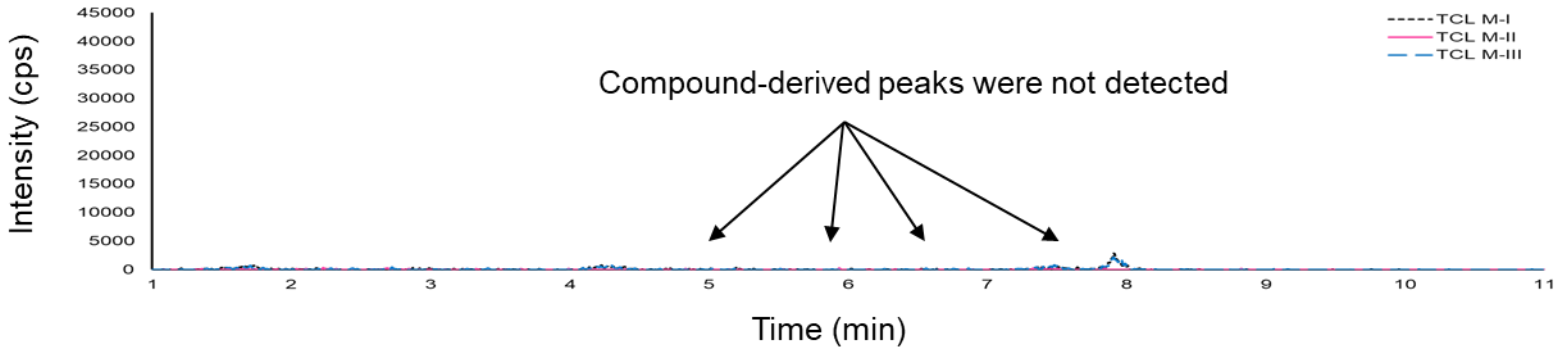
これまで腸内細菌によるタクロリムスの代謝産物として、ヒトにおける主要代謝産物 13-*O*-Desmethyl tacrolimus（M-I）であったことが報告されている[101]。ヒトにおけるタクロリムスの主要代謝産物である M-I、15-*O*-Desmethyl tacrolimus（M-II）、31-*O*-Desmethyl tacrolimus（M-III）[105] を用いて、ビオスリー由来の *Bacillus subtilis TO-A* により、これら 3 種のいずれかに変換されるかを評価した。培地添加時のタクロリムス濃度が 1000 ng/mL であることから変換率換算で 1% にあたる 10 ng/mL を検出限界として評価を行った。各標品（10 ng/mL）を含む培地を前処理したもの（a）、薬液を含まない培養後培地を前処理したもの（b）および *Bacillus subtilis TO-A* を接種して培養した培地を前処理したもの（c）のクロマトグラムと各代謝物の構造式を Figure 10 に示す。細菌を接種した培地から M-I、M-II、M-III に干渉するピークは観測されなかった。また、*Bacillus subtilis TO-A* を接種した薬物を含む培地から M-I、M-II、M-III は検出されなかった。

この結果より *Bacillus subtilis TO-A* の薬物消失経路はヒトにおけるタクロリムスの主要代謝産物への変換ではないことが示された。

(a) Tacrolimus metabolites standard (10 ng/mL)



(b) *B. subtilis TO-A* inoculated on BHI broth



(c) *B. subtilis TO-A* inoculated on BHI broth with tacrolimus

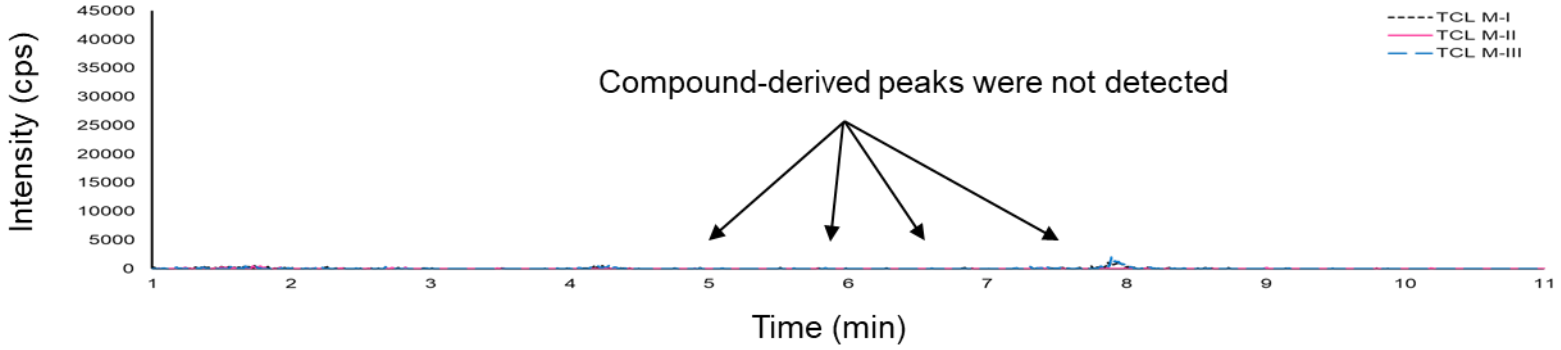


Figure 10 Chromatogram of tacrolimus metabolites, negative control and sample

B. subtilis TO-A, Bacillus subtilis TO-A; cps, count per second; min, minute.

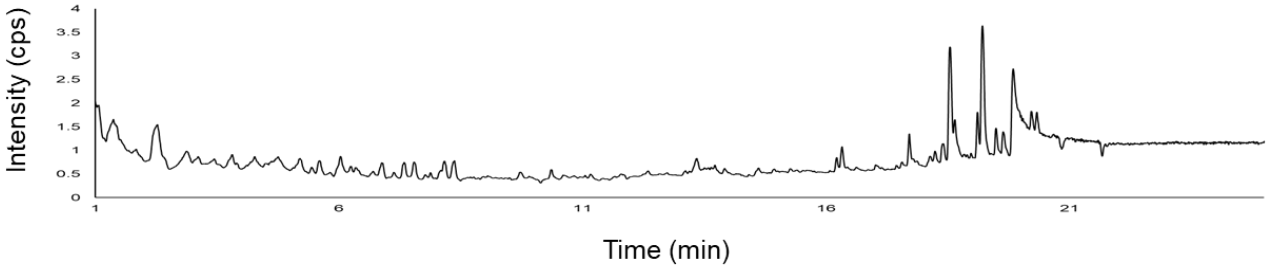
スキャンモードによる代謝産物の網羅的探索

タクロリムスの *Bacillus subtilis TO-A* による代謝産物がヒトにおける主要代謝産物ではなかったことからスキャンモードを用いて代謝産物の探索を行った。なお、薬物残存率の低下が認められた *Clostridium butyricum* についても代謝産物の網羅的探索を実施した。

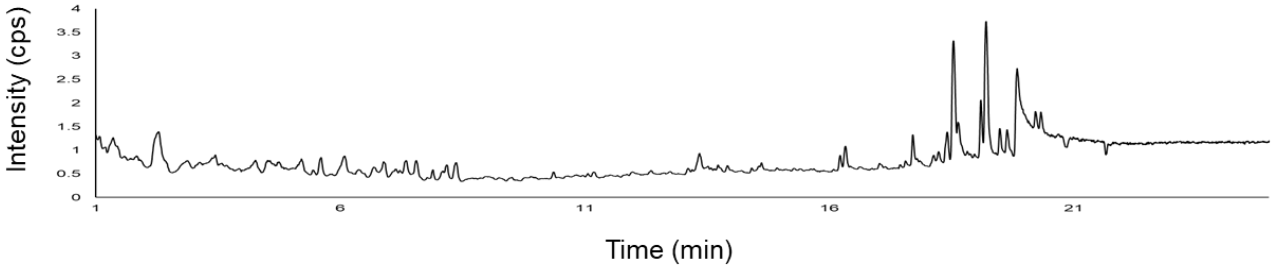
それぞれのトータルイオンクロマトグラムを Figure 11 に示す。スキャン範囲は m/z が 100 - 400（a, b, c, d, e, f）、400 - 700（g, h, i, j, k, l）、700 - 1000（m, n, o, p ,q, r）に分けてデータを取得した。薬物を含む BHI 培地に細菌を接種させない状態で 24 時間培養したネガティブコントロール（a, g, m）のうち、(m）のクロマトグラムではタクロリムスおよびエベロリムスに由来するピークが観測された。薬物を含まない BHI 培地に *Bacillus subtilis TO-A*（b, h, n）または *Clostridium butyricum*（d, j, p）を接種させて 24 時間培養したブランク試料では、細菌の生存により培地から消失する化合物または新規に生じる化合物のピークが確認された。

続いて、それぞれの培養後培地試料から得られたクロマトグラムとネガティブコントロールおよびブランク試料のクロマトグラムを比較し、新規に生じたピークの探索を行った。培養後培地試料とは薬物を含む BHI 培地に *Bacillus subtilis TO-A*（c, i, o）、ビオスリー由来の *Clostridium butyricum*（e, k, q）またはミヤ BM 由来の *Clostridium butyricum*（f, l, r）のいずれかを接種させて 24 時間培養したものである。*Bacillus subtilis TO-A* の培養後培地試料ではタクロリムスおよびエベロリムスの消失に伴い新たに生じるピークは観測されなかった。一方で *Clostridium butyricum* の培養後培地試料では新たに生じたピークが観測され、m/z を確認したところタクロリムスの$[M+Na+2]^+$の m/z である 829 が確認された。

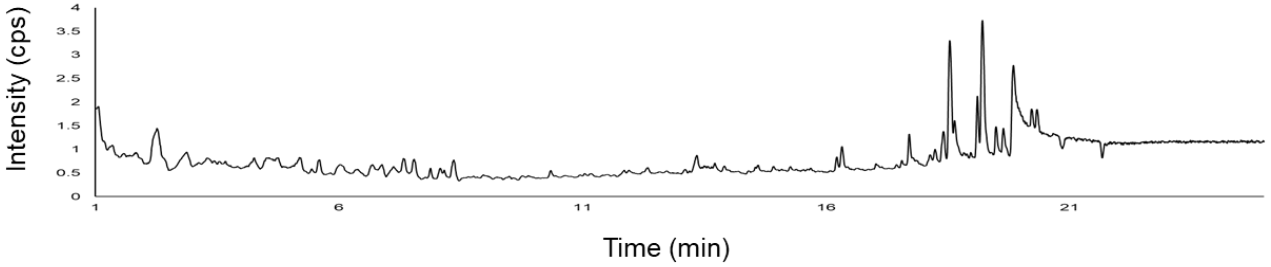
(a) Negative control (m/z 100-400)



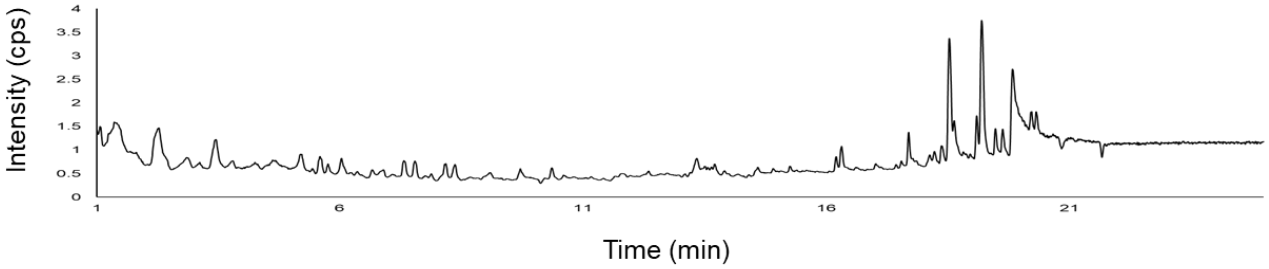
(b) Blank sample of *B. subtilis TO-A* (m/z 100-400)



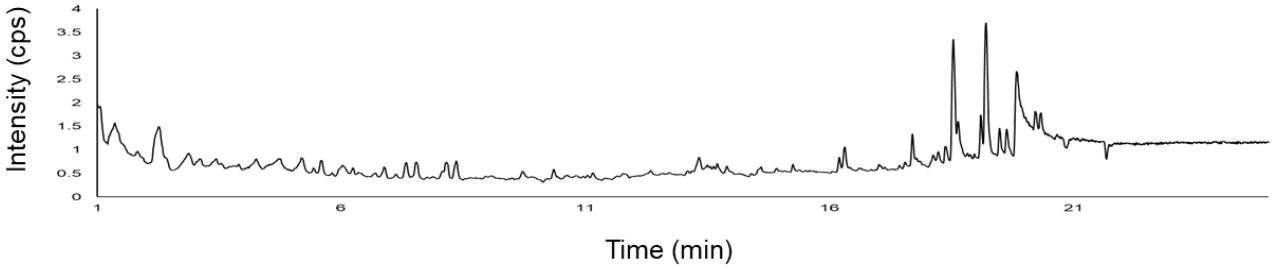
(c) Sample of *B. subtilis TO-A* (m/z 100-400): No new peaks were observed compared to the chromatograms of (a) and (b)



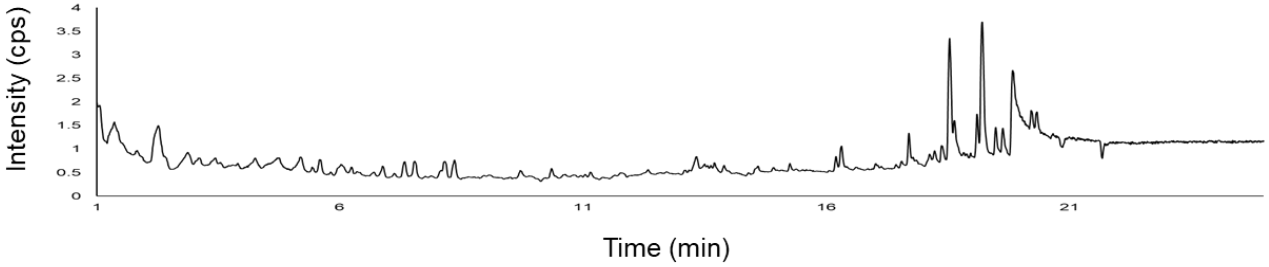
(d) Blank sample of *C. butyricum* (m/z 100-400)



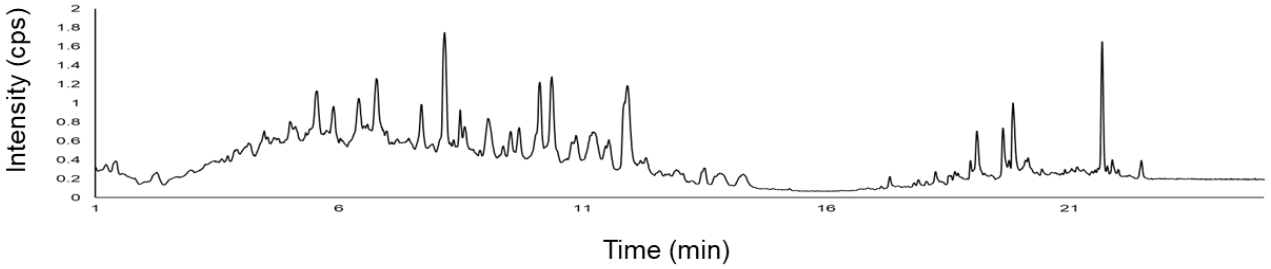
(e) Sample of *C. butyricum* from Bio-Three (m/z 100-400): No new peaks were observed compared to the chromatograms of (a) and (d)



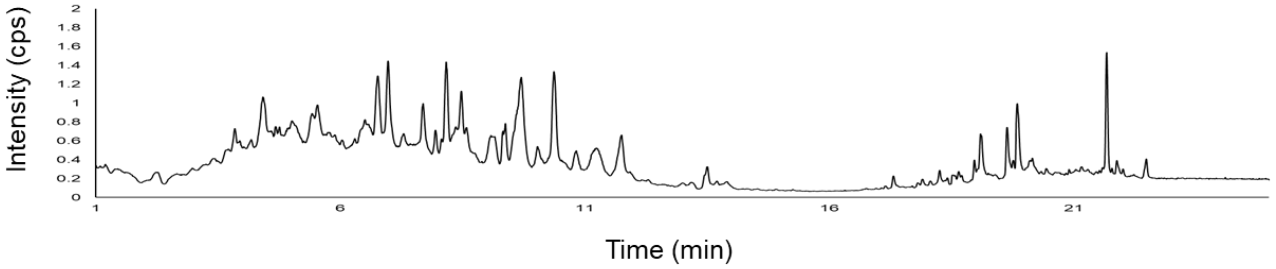
(f) Sample of *C. butyricum* from Miya BM (m/z 100-400): No new peaks were observed compared to the chromatograms of (a) and (d)



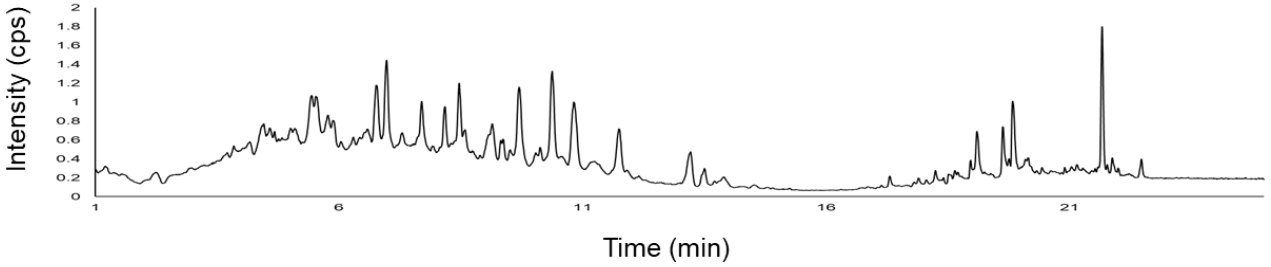
(g) Negative control (m/z 400-700)



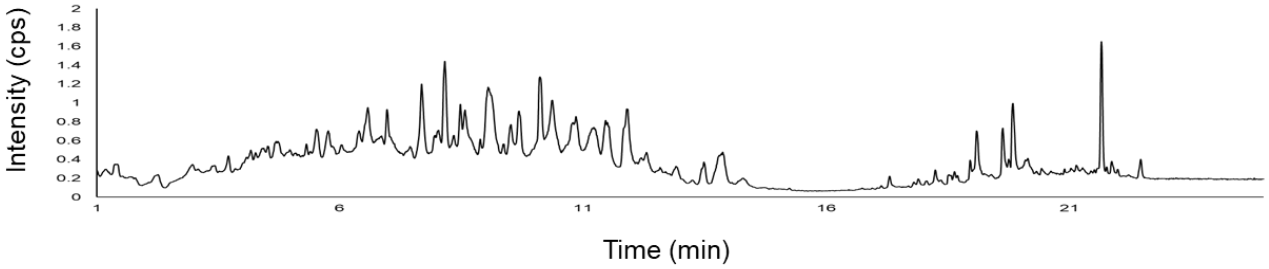
(h) Blank sample of *B. subtilis TO-A* (m/z 400-700)



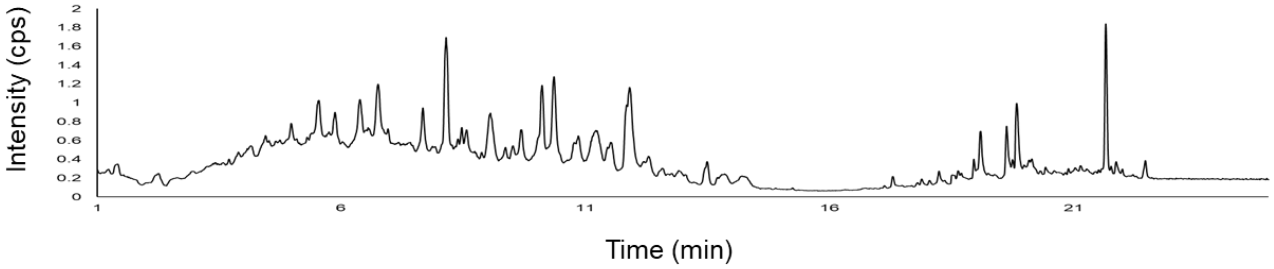
(i) Sample of *B. subtilis TO-A* (m/z 400-700): No new peaks were observed compared to the chromatograms of (g) and (h)



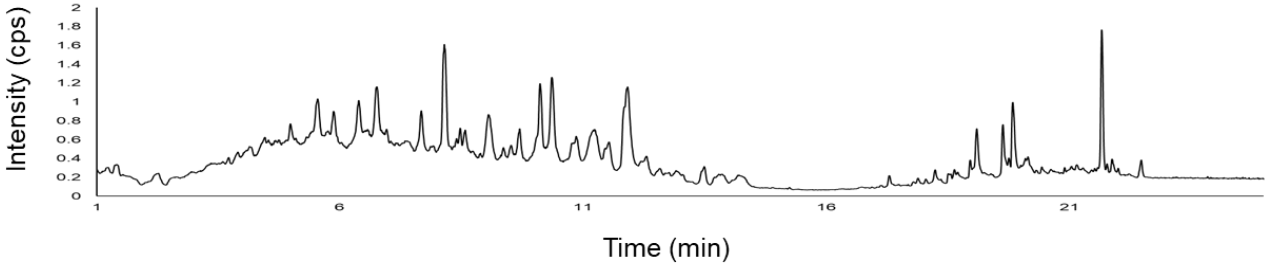
(j) Blank sample of *C. butyricum* (m/z 400-700)



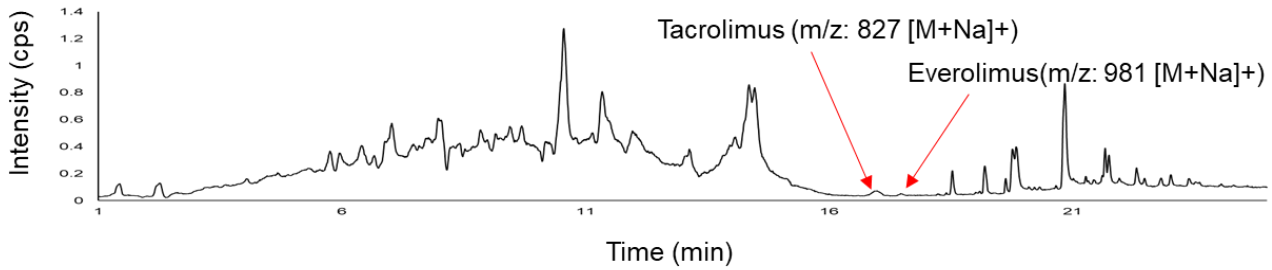
(k) Sample of *C. butyricum* from Bio-Three (m/z 400-700): <u>No new peaks were observed compared to the chromatograms of (g) and (j)</u>



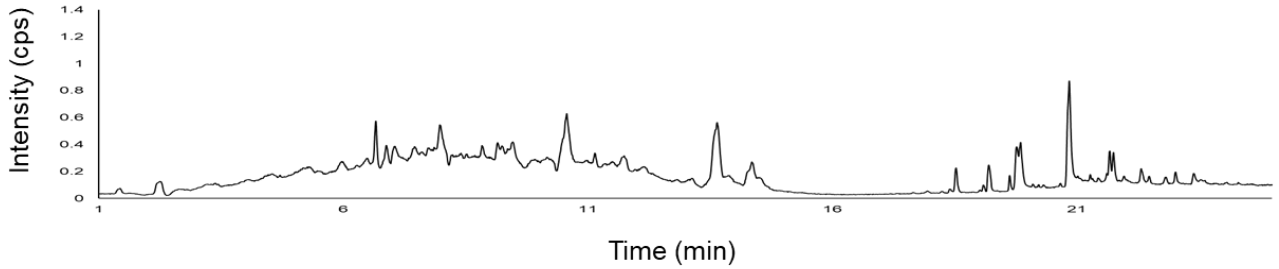
(l) Sample of *C. butyricum* from Miya BM (m/z 400-700): <u>No new peaks were observed compared to the chromatograms of (g) and (j)</u>



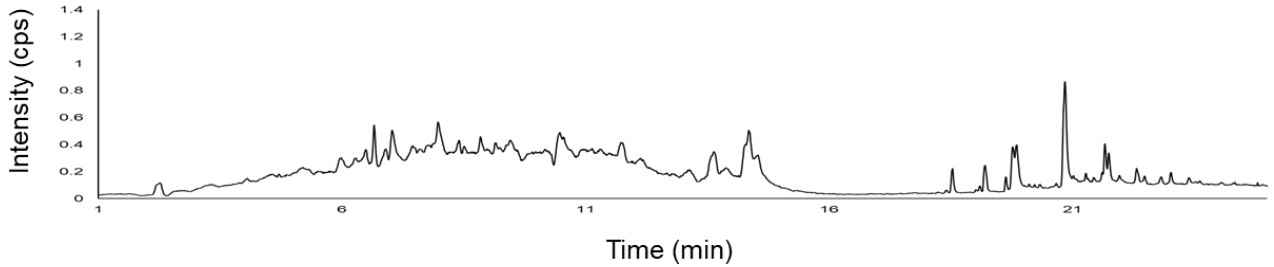
(m) Negative control (m/z 700-1000): <u>The peaks derived from tacrolimus and everolimus were observed</u>



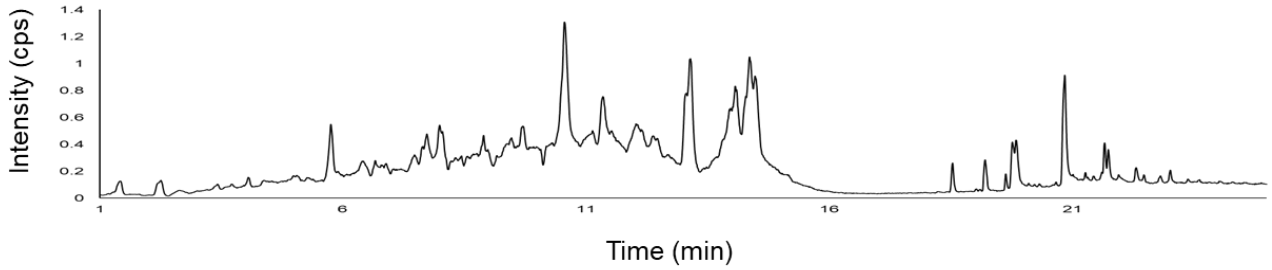
(n) Blank sample of *B. subtilis TO-A* (m/z 700-1000)



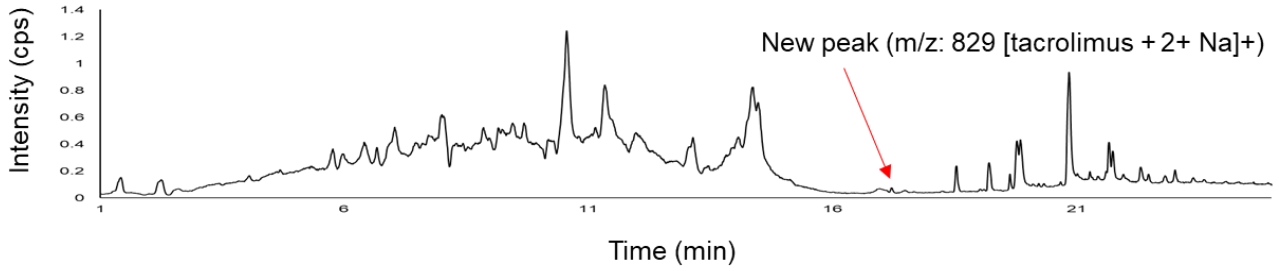
(o) Sample of *B. subtilis TO-A* (m/z 700-1000): <u>No new peaks were observed compared to the chromatograms of (m) and (n)</u>



(p) Blank sample of *C. butyricum* (m/z 700-1000)



(q) Sample of *C. butyricum* from Bio-Three (m/z 700-1000): <u>The peak derived from new compound was observed</u>



(r) Sample of *C. butyricum* from Miya BM (m/z 700-1000): <u>The peak derived from new compound was observed</u>

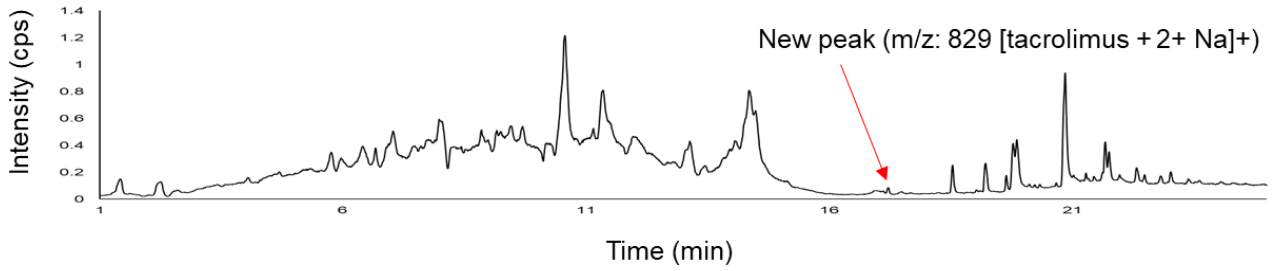


Figure 11 Total ion chromatogram of negative control, blank sample and sample

B. subtilis TO-A, *Bacillus subtilis TO-A*; *C. butyricum*, *Clostridium butyricum*; cps, count per second; min, minute.

第四節 考察

整腸剤から単離した細菌を用いた経口分子標的薬 5 種の *in vitro* スクリーニング（Figure 6）において *Bacillus subtilis TO-A* はエルロチニブを除く 4 つの薬物の残存濃度を低下させ、中でもオシメルチニブは 35% 程度の低下が見られた。医療用医薬品であるビオスリーとオシメルチニブの併用では含まれる細菌による影響を受ける可能性があるものの、他の 4 種類の経口分子標的薬は *in vitro* スクリーニングの結果から整腸剤に含まれる細菌による代謝を受けにくいことが示唆された。

整腸剤および健康食品から単離した細菌を用いた免疫抑制薬 3 種の *in vitro* スクリーニング（Figure 7）において、*Bacillus subtilis TO-A* は培地中のタクロリムスおよびエベロリムスの残存率を大幅に低下させた。同様に *Bacillus subtilis 168*、*Bacillus subtilis 3610*、*Bacillus subtilis Natto* も培地中のタクロリムスおよびエベロリムスの残存率を大幅に低下させた（Figure 8）。

そこでタクロリムスとエベロリムスについて *Bacillus subtilis* を主として医薬品の消失機構の解明を目指した。まず各 *Bacillus subtilis* 株において Sup、CL、Deb と WCL と定義する画分の作成を行った。薬物を含む培地と混合して残存率の変化を評価し、残存率低下に関わる因子がどの画分に存在するかを探索した。Sup には菌体外に分泌されたプロテアーゼなどの蛋白が存在しており、CL には菌体内に局在する蛋白やリボソームが存在する。Deb には細菌の細胞膜、細胞壁、外膜などの不溶性成分が含まれ、WCL は Deb、Sup および CL のすべての成分が含まれる。Figure 9 よりタクロリムスとエベロリムスともに Sup で培養したものと WCL で培養したものとで同程度の薬物残存率が低下したことから、Sup 由来の因子が主に薬物の消失に関与していることが示唆された。一方で CL、Deb 添加時にも残存率の低下が見られるものがあったことから、単

一の消失経路ではなく複数の因子が薬物の消失に絡んでおり、その寄与率は *Bacillus subtilis* の中でも細菌株ごとに異なるものと考えられた。

In vitro 評価系における一連の検討結果は、*Bacillus subtilis TO-A*、*Bacillus subtilis 3610*、*Bacillus subtilis 168* および *Bacillus subtilis natto* がタクロリムス並びにエベロリムスを消失させることを示唆した。

ヒトにおけるタクロリムスの主要代謝産物である M-I が腸内細菌の一部で代謝により産生されることが報告[101]されている。*Bacillus subtilis* もヒトにおけるタクロリムスの主要代謝産物への変換を行うかどうかについて M-I、M-II、M-III の標品を用いて定性を試みた。培地のタクロリムスの初期培地濃度が 1000 ng/mL であることから検出限界を初期濃度の 1% にあたる 10 ng/mL として検出を試みたが、いずれの培地からヒトにおけるタクロリムスの主要代謝産物 3 種に特有のピークは検出されなかった（Figure 10）。このことから *Bacillus subtilis* によるタクロリムスの変換はヒトにおける主要代謝産物への変換が主ではなく、別の経路であると考えられる。エステル結合をもつマクロライド系化合物であるタクロリムスとエベロリムスは *Bacillus subtilis* の存在下で培地内の薬物残存率が低下した。一方、アミド結合しか持たない環状ペプチドであるシクロスポリン A は残存率の低下が見られなかった（データ未収載）。マクロライド系抗菌薬は様々な機構による耐性獲得が報告[106]されており、23SrRNA のメチル化やマクロライドの細菌外への排泄蛋白質の獲得のような細菌側の因子の変化のほかに、マクロライドのリン酸化またはグリコシル化やマクロライドのラクトン環の開環のようにマクロライド自体を変換する場合もあり[106]、このような化合物の修飾が残存率の低下に関与した可能性が考えられる。

ヒトにおけるタクロリムスの主要代謝産物を検出できなかったことから、LC-MS/MS のスキャンモードを用いて未知の代謝物の検出を試みた（Figure 11）。

スキャンモードでの探索は *Bacillus subtilis TO-A* に加えて、薬物の変換が見られた *Clostridium butyricum* についても探索を行った。*Bacillus subtilis TO-A* を接種して培養した培地からは、細菌が生存するにあたり産生する化合物のピークに加え、培地由来の化合物のピークが多く、LC-MS/MS では新規に生じる化合物の検出が不可能であった。一方で、*Clostridium butyricum* を接種して培養した培地では、タクロリムスの後ろに新規のピークが確認された。薬物を含まない *Clostridium butyricum* の培養上清では検出されなかったことから、同定を進めてタクロリムスの$[M+Na+2]^+$ の m/z と一致する 829 であった。これは既報の細菌によるタクロリムスの代謝産物であるの m/z と一致した[16]。構造を決定するため精製を試みたが交雑物が多いため精製が行えず、正式な化合物の決定は行えなかった。*Clostridium butyricum* を接種して培養した培地のスキャンデータからヒトにおけるタクロリムスの主要代謝産物の m/z である 813 由来のピークは観測されなかったことからヒトにおけるタクロリムスの主要代謝産物への変換は行われていないことが示唆された（データ未収載）。また、*Bacillus subtilis TO-A* を接種して培養した培地からはタクロリムスの$[M+Na+2]^+$の m/z である 829 のピークは観測されなかったことから細菌の種類により代謝経路が異なることが示された。

In vitro の結果や外部から摂取した細菌の 8% は生きたまま回腸まで到達するという報告[19]から、納豆および *Bacillus subtilis TO-A* を含む整腸剤であるビオスリー®とタクロリムスおよびエベロリムスを同時摂取した場合、生体内でも同様に体内動態が変化することが予測された。これまでの腸内細菌叢とタクロリムスの投与量に関する報告においても、タクロリムスの血中濃度を同程度にするために必要な投与量が腸内細菌叢に *Faecalibacterium prausnitzii* が含まれ

るか否かで約 3 倍（9.6 ± 2.4 mg/day vs. 3.3 ± 1.5 mg/day）もの差が見られた[8]ことから、同様の影響が生じること可能性が考えられた。

本研究にはいくつかの Limitations がある。培地を用いた *in vitro* スクリーニングでの Limitations として細菌間・株間の増殖性を考慮していないことが挙げられる。増殖性の違いを考慮していないことから、細菌が薬物変換に及ぼす影響について今回スクリーニングを行った細菌間・株間で比較することはできない。加えて、培養に使用した BHI 培地では増殖の悪い細菌も見られたことに加えて栄養環境によって細菌は代謝を大きく変化させることから、今回の *in vitro* スクリーニングでは薬物の変換に影響を認めない結果になっている細菌に関しても、免疫抑制薬・経口分子標的薬の変換を引き起こす可能性が否定できない。

また医薬品の体内動態は吸収の他に、分布・代謝・排泄という合計 4 つの段階を通して規定される。腸内細菌の産生する化合物が薬物代謝酵素の発現を変化させることが動物実験の結果から示唆されている[107,108]ほか、細菌の種類・胃腸の状態によっては継続的なプロバイオティクスにより胃内排泄速度が変化することが報告[95]されている。今回 *in vitro* 評価系では残存率の低下が見られなかった細菌についても、動物実験を実施することで医薬品の体内動態への影響を評価する必要があると思われる。

第五節 小括

医薬品－微生物相互作用について理解を深めるため、整腸剤や発酵食品由来の経口摂取可能な細菌と薬物血中濃度の変化が治療効果に大きく影響する医薬品を対象として *in vitro* スクリーニング系の構築を行い、実践した。一部の細菌と医薬品間で、医薬品の残存率低下が見られた。残存率の低下の大きかった免疫抑制薬であるタクロリムスおよびエベロリムスについて消失機構の解明を目指した結果、*Bacillus subtilis* による残存率の低下は菌体外に分泌された因子が主要因であることが示唆された。代謝産物の網羅的探索を行った結果、*Bacillus subtilis TO-A* による代謝産物の同定には至らなかった。一方、*Clostridium butyricum* によるタクロリムスの代謝産物としてタクロリムスの$[M+Na+2]^+$の m/z である 829 の化合物が検出された。m/z が 829 のピークは *Bacillus subtilis TO-A* を培養した培地からは見られなかった。また、今回検討を進めた 2 種類の細菌はいずれも 13-*O*-Desmethyl tacrolimus への変換は行っていなかった。したがって、細菌の種類により代謝経路が異なることが示唆された。得られた一連の結果と外部から摂取した細菌の 8% は生きたまま回腸まで到達するという報告から、納豆または *Bacillus subtilis TO-A* を含む整腸剤であるビオスリー®とタクロリムスおよびエベロリムスを同時摂取した場合、生体内でも同様に体内動態が変化する可能性が考えられた。今回得られた知見は、経口摂取可能な微生物と医薬品間で相互作用が生じる可能性を示唆しており、さらに多くの情報を取得することで、医薬品－微生物相互作用についての理解を深めることを可能とするものと期待される。

総括

本研究では、近年着目される微生物と医薬品の相互作用の中で、医薬品との経口摂取可能な微生物間の相互作用について以下の結論を得た。

第一章 液体クロマトグラフィータンデム質量法（LC-MS/MS）を用いた医薬品の一斉分析系の構築

医薬品の血中濃度測定など分析化学分野において近年着目されている LC-MS/MS を用いて医薬品の一斉分析系の構築を行った。経口分子標的薬一斉分析系では 1 検体あたり 7 分で 12 薬物（アファチニブ、アレクチニブ、クリゾチニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、レンバチニブ、ニロチニブ、オシメルチニブ、ポナチニブ、ソラフェニブ）が定量可能であった。これまでに報告されている医薬品の一斉分析系の多くは安定同位体を用いた内標準法で定量を行っており、測定対象それぞれに対する内部標準物質が必要なため測定を行うにあたりコスト面から臨床への応用に対する敷居が高い。今回構築した分析系では 12 薬物に対して 1 つの内部標準物質を用いた内標準法にて定量ができるため、対象薬物の測定を低コストかつ効率的に実践可能であった。

また免疫抑制薬においては、1 アッセイ 5 分という短時間での測定を可能とした。全血中においてはタクロリムスとエベロリムスの 2 種類を同時に測定できることが示された。

構築した 2 つの分析系は米国食品医薬品局の「Guidance for Industry, Bioanalytical method validation」に準じてバリデーションを実施した。

6 個体から得られた個別のブランクマトリックスを用いて測定対象薬物や内部標準物質に干渉するピークの有無を評価した結果、タクロリムスを除く全て

の測定対象で測定対象と重なるピークは観測されなかった。またタクロリムスは重なるピークが検出されてものの、ピーク高さをレスポンスと定義して定量下限のレスポンスの 20% 以内のピーク高さであったから、全ての薬物で選択性が良好であった。また作成した検量線は、全薬物で FDA のバリデーションガイドラインの許容基準である決定係数が 0.99 以上であり、回帰式から求めた検量線用試料の各濃度の真度がすべて 100±15% 以内であることを満たした。経口分子標的薬ではダイナミックレンジでの測定を可能とし、最高薬物血中濃度から内服前薬物血中濃度まで測定可能であった。また免疫抑制薬ではタクロリムス・エベロリムスともに 1 - 40 ng/mL で定量が可能であり、日常診療でみられる両薬物の治療域をカバー可能であった。

繰り返し分析を行い、再現性の確認を行った結果では、全薬物で FDA のバリデーションガイドラインの許容基準である真度が 100±15% 以内かつ精度が 15% 以内を満たし、再現よく測定が可能であることが示された。

マトリックスファクターの結果は、内部標準物質を用いて補正することで全薬物とも FDA のバリデーションガイドラインの許容基準である C.V.% が 15% 以内を満たした。免疫抑制薬のようにマトリックスの影響を受けやすい薬物も、内標準法を用いることでマトリックスによる影響なく測定が可能あった。

回収率の結果は、FDA のバリデーションガイドラインの許容基準である C.V.% が 15% 以内を満たした。マトリックスファクターと回収率の結果から、2 つの分析系の前処理方法は定量値がマトリックスの影響を受けないことが示された。

安定性の結果から、経口分子標的薬の測定系では、オシメルチニブが保管条件を決定する因子となり、室温で保管が困難であったが 5°C 保管で 6 時間また

は-30°C 保管で 3 日間保管可能であった。また免疫抑制薬は室温下で 24 時間、5°C 保管で 72 時間、-80°C 保管で 4 週間の保管可能であった。

以上の結果より、2 つの分析系の定量値への信頼性は十分に保証されているものであることが示され、薬物治療における薬物血中濃度モニタリングを可能とするばかりでなく、体内動態の個人差が大きい免疫抑制薬と整腸剤や発酵食品由来の微生物との相互作用を切り口とした体内動態の個人差解明に関する研究を進めていくにあたり、基盤となることが示された。

第二章 医薬品－微生物間相互作用の *in vitro* スクリーニングと消失機構の解明

医薬品－微生物相互作用について理解を深めるための評価系の構築を行い、実践した。まず、経口分子標的薬 5 薬品と免疫抑制薬 3 薬品に関して、経口摂取する可能性のある細菌数種類で *in vitro* スクリーニングを行った。医療用医薬品であるビオスリーに含まれる *Bacillus subtilis TO-A* は、経口分子標的薬であるオシメルチニブおよび免疫抑制薬であるタクロリムス・エベロリムスの培地中薬物残存率を低下させた。薬物残存率が大幅に低下したタクロリムスとエベロリムスに着目してさらなる検討を進め、納豆菌 *Bacillus subtilis natto* や標準株 *Bacillus subtilis 168* でも同様の傾向が見られたことから、これらの免疫抑制薬に対して *Bacillus subtilis* は代謝能を持つことが示された。薬物の消失に起因する因子の、細菌における存在位置を特定するため画分を用いて検討を行い、これら 2 つの免疫抑制薬の残存率低下は菌体外に分泌される因子が主要因であることと複数の因子が関与していることが示唆された。さらに *Bacillus subtilis* でも細菌株の違いにより各因子の残存率低下に対する寄与率が異なることが示された。標品を用いた代謝産物の定性では、*Bacillus subtilis* による薬物の変

換はこれまで報告のあるヒトにおけるタクロリムスの主要代謝産物（13-*O*-Desmethyl tacrolimus）への変換ではなかった。スキャンモードを用いた代謝産物の網羅的探索では、*Clostridium butyricum* を用いた培養上清で新規に生じたピークが、タクロリムスの$[M+Na+2]^+$の m/z である 829 と一致する化合物であったことからこの化合物が代謝物であることが示唆された。一方で *Clostridium butyricum* を用いた培養上清のスキャンデータからヒトにおけるタクロリムスの主要代謝産物の m/z である 813 由来のピークは観測されず、*Bacillus subtilis* を用いた培養上清ではタクロリムスの$[M+Na+2]^+$の m/z である 829 のピークは観測されなかったことから、細菌の種類により代謝経路が異なることが示された。*In vitro* の結果や外部から摂取した細菌の 8% は生きたまま回腸まで到達するという報告から、納豆および *Bacillus subtilis TO-A* を含む整腸剤であるビオスリー®とタクロリムスおよびエベロリムスを同時摂取した場合、生体内でも同様に体内動態が変化することが予測された。今回第二章で得られた知見は、経口摂取可能な微生物と医薬品間で相互作用が生じる可能性を示唆しており、さらに多くの情報を取得することで、医薬品－微生物相互作用についての理解を深めることを可能とするものと期待される。

参考文献

1. Kurata, Y. *et al.* Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* **72**, 209–219 (2002).
2. Nishizato, Y. *et al.* Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* **73**, 554–565 (2003).
3. Duarte, J. D. & Cavallari, L. H. Pharmacogenetics to guide cardiovascular drug therapy. *Nat Rev Cardiol* **18**, 649–665 (2021).
4. Daly, A. K. Pharmacogenetics: a general review on progress to date. *Br Med Bull* **124**, 65–79 (2017).
5. Minami, H. *et al.* Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: roles of UGT1A1*6 and *28. *Pharmacogenet Genomics* **17**, 497–504 (2007).
6. Guthrie, L., Gupta, S., Daily, J. & Kelly, L. Human microbiome signatures of differential colorectal cancer drug metabolism. *NPJ Biofilms Microbiomes* **3**, 27 (2017).
7. Wallace, B. D. *et al.* Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science (1979)* **330**, 831–835 (2010).
8. Lee, J. R. *et al.* Gut microbial community structure and complications after kidney transplantation: a pilot study. *Transplantation* **98**, 697–705 (2014).
9. Lindenbaum, J., Rund, D. G., Butler, V. P., Tse-Eng, D. & Saha, J. R. Inactivation of digoxin by the gut flora: reversal by antibiotic therapy. *N Engl J Med* **305**, 789–794 (1981).
10. Davani-Davari, D. *et al.* Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* **8**, 92 (2019).
11. Tremaroli, V. & Bäckhed, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* **489**, 242–249 (2012).
12. Azad, M. A. K., Sarker, M. & Wan, D. Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *Biomed Res Int* **2018**, 8063647 (2018).
13. Asha, M. Z. & Khalil, S. F. H. Efficacy and Safety of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in the Treatment of Irritable Bowel Syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Sultan Qaboos Univ Med J* **20**, e13–e24 (2020).
14. Probiotics Market Size | Industry Report, 2021 -2030. https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/probiotics-market.

15. Probiotic usage increased following pandemic, says recent consumer survey. https://www.nutritionaloutlook.com/view/probiotic-usage-increased-following-pandemic-says-recent-consumer-survey.
16. Zimmermann, M., Zimmermann-Kogadeeva, M., Wegmann, R. & Goodman, A. L. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature* **570**, 462–467 (2019).
17. Ladirat, S. E. *et al.* High-throughput analysis of the impact of antibiotics on the human intestinal microbiota composition. *J Microbiol Methods* **92**, 387–397 (2013).
18. Sekirov, I., Russell, S. L., Caetano M Antunes, L. & Finlay, B. B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* **90**, 859–904 (2010).
19. Takada, T. *et al.* Dynamic analysis of human small intestinal microbiota after an ingestion of fermented milk by small-intestinal fluid perfusion using an endoscopic retrograde bowel insertion technique. *Gut Microbes* **11**, 1662–1676 (2020).
20. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry | FDA. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry.
21. 「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（平成25年07月11日薬食審査発第711001号）. https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tb9534&dataType=1&pageNo=1.
22. Mok, T. S. *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* **361**, 947–957 (2009).
23. Paez, J. G. *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science (1979)* **304**, 1497–1500 (2004).
24. Rosell, R. *et al.* Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* **13**, 239–246 (2012).
25. Sequist, L. V. *et al.* Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* **31**, 3327–3334 (2013).
26. Ramalingam, S. S. *et al.* Osimertinib As First-Line Treatment of EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* **36**, 841–849 (2018).
27. Camidge, D. R. *et al.* Updated Efficacy and Safety Data and Impact of the EML4-ALK Fusion Variant on the Efficacy of Alectinib in Untreated ALK-Positive Advanced Non-Small Cell Lung Cancer in the Global Phase III ALEX Study. *J*

Thorac Oncol **14**, 1233–1243 (2019).

28. O'Brien, S. G. *et al.* Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **348**, 994–1004 (2003).
29. Druker, B. J. *et al.* Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **355**, 2408–2417 (2006).
30. Kantarjian, H. *et al.* Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **362**, 2260–2270 (2010).
31. Saglio, G. *et al.* Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **362**, 2251–2259 (2010).
32. Cortes, J. E. *et al.* Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA trial. *J Clin Oncol* **30**, 3486–3492 (2012).
33. Ohnishi, K. *et al.* Long-term outcome following imatinib therapy for chronic myelogenous leukemia, with assessment of dosage and blood levels: the JALSG CML202 study. *Cancer Sci* **103**, 1071–1078 (2012).
34. Ichihara, E. *et al.* Impact of physical size on gefitinib efficacy in patients with non-small cell lung cancer harboring EGFR mutations. *Lung cancer* **81**, 435–439 (2013).
35. Gao, B. *et al.* Evidence for therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapies. *J Clin Oncol* **30**, 4017–4025 (2012).
36. Mizuno, T. *et al.* ABCG2 421C>A polymorphism and high exposure of sunitinib in a patient with renal cell carcinoma. *Ann Oncol* **21**, 1382–1383 (2010).
37. Lankheet, N. A. G. *et al.* Plasma concentrations of tyrosine kinase inhibitors imatinib, erlotinib, and sunitinib in routine clinical outpatient cancer care. *Ther Drug Monit* **36**, 326–334 (2014).
38. Widmer, N. *et al.* Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two--targeted therapies. *Eur J Cancer* **50**, 2020–2036 (2014).
39. Klümpen, H. J., Samer, C. F., Mathijssen, R. H. J., Schellens, J. H. M. & Gurney, H. Moving towards dose individualization of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev* **37**, 251–260 (2011).
40. Le Coutre, P. *et al.* Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588. *Cancer Chemother Pharmacol* **53**, 313–323 (2004).
41. Takasaki, S. *et al.* Relationships between sunitinib plasma concentration and clinical outcomes in Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* **23**, 936–943 (2018).

42. Numakura, K. *et al.* Clinical implications of pharmacokinetics of sunitinib malate and N-desethyl-sunitinib plasma concentrations for treatment outcome in metastatic renal cell carcinoma patients. *Oncotarget* **9**, 25277–25284 (2018).
43. Lankheet, N. A. G. *et al.* Pharmacokinetically guided sunitinib dosing: a feasibility study in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* **110**, 2441–2449 (2014).
44. Picard, S. *et al.* Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* **109**, 3496–3499 (2007).
45. Larson, R. A. *et al.* Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* **111**, 4022–4028 (2008).
46. Bouchet, S. *et al.* Therapeutic drug monitoring of imatinib in chronic myeloid leukemia: experience from 1216 patients at a centralized laboratory. *Fundam Clin Pharmacol* **27**, 690–697 (2013).
47. Mendel, D. B. *et al.* In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: Determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clinical Cancer Research* **9**, 327–337 (2003).
48. Picard, S. *et al.* Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* **109**, 3496–3499 (2007).
49. Guilhot, F. *et al.* Plasma exposure of imatinib and its correlation with clinical response in the Tyrosine Kinase Inhibitor OPtimization and Selectivity trial. *Haematologica* **97**, 731–738 (2012).
50. Soulieres, D. *et al.* Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *J Clin Oncol* **22**, 77–85 (2004).
51. Nakamura, Y. *et al.* Pharmacokinetics of gefitinib predicts antitumor activity for advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **5**, 1404–1409 (2010).
52. Faivre, S. *et al.* Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* **24**, 25–35 (2006).
53. Peng, B. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Oncol* **22**, 935–942 (2004).
54. Tiseo, M. *et al.* Correlation between erlotinib pharmacokinetics, cutaneous toxicity and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer

(NSCLC). *Lung Cancer* **83**, 265–271 (2014).
55. Hirose, T. *et al.* Association of pharmacokinetics and pharmacogenomics with safety and efficacy of gefitinib in patients with EGFR mutation positive advanced non-small cell lung cancer. *Lung cancer* **93**, 69–76 (2016).
56. McMaster, P. *et al.* Therapeutic drug monitoring of tacrolimus in clinical transplantation. *Ther Drug Monit* **17**, 602–605 (1995).
57. Jusko, W. J. Analysis of tacrolimus (FK 506) in relation to therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* **17**, 596–601 (1995).
58. Undre, N. A. *et al.* Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc* **31**, 296–298 (1999).
59. Staatz, C. E. & Tett, S. E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet* **43**, 623–653 (2004).
60. Kovarik, J. M. *et al.* Everolimus therapeutic concentration range defined from a prospective trial with reduced-exposure cyclosporine in de novo kidney transplantation. *Ther Drug Monit* **26**, 499–505 (2004).
61. Meier-Kriesche, H. U., Schold, J. D. & Kaplan, B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* **4**, 1289–1295 (2004).
62. Issa, N., Kukla, A. & Ibrahim, H. N. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a review and perspective of the evidence. *Am J Nephrol* **37**, 602–612 (2013).
63. Ringe, B. *et al.* A novel management strategy of steroid-free immunosuppression after liver transplantation: efficacy and safety of tacrolimus and mycophenolate mofetil. *Transplantation* **71**, 508–515 (2001).
64. Witt, C. & Hachem, R. Immunosuppression: what's standard and what's new? *Semin Respir Crit Care Med* **34**, 405–413 (2013).
65. Chan, L., Hartmann, E., Cibrik, D., Cooper, M. & Shaw, L. M. Optimal everolimus concentration is associated with risk reduction for acute rejection in de novo renal transplant recipients. *Transplantation* **90**, 31–37 (2010).
66. Nankivell, B. J. *et al.* The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* **349**, 2326–2333 (2003).
67. Morales, J. M. *et al.* Sirolimus does not exhibit nephrotoxicity compared to cyclosporine in renal transplant recipients. *Am J Transplant* **2**, 436–442 (2002).
68. Kurdián, M. *et al.* Delayed mTOR inhibition with low dose of everolimus reduces TGFβ expression, attenuates proteinuria and renal damage in the renal mass reduction model. *PLoS One* **7**, (2012).
69. Jiang, L. *et al.* Rheb/mTORC1 signaling promotes kidney fibroblast activation and

fibrosis. *J Am Soc Nephrol* **24**, 1114–1126 (2013).

70. Hustert, E. *et al.* The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* **11**, 773–779 (2001).
71. Berge, M. *et al.* Safe management of tacrolimus together with posaconazole in lung transplant patients with cystic fibrosis. *Ther Drug Monit* **31**, 396–399 (2009).
72. Rordorf, C., Rouilly, M., Figueiredo, J., Kalbag, J. & O'Bannon, L. F. Differential influence of two cyclosporine formulations on everolimus pharmacokinetics: a clinically relevant pharmacokinetic interaction. *J Clin Pharmacol* **42**, 95–99 (2002).
73. Rostaing, L., Christiaans, M. H. L., Kovarik, J. M. & Pascual, J. The pharmacokinetics of everolimus in de novo kidney transplant patients receiving tacrolimus: an analysis from the randomized ASSET study. *Ann Transplant* **19**, 337–345 (2014).
74. Pascual, J. *et al.* Interaction between everolimus and tacrolimus in renal transplant recipients: a pharmacokinetic controlled trial. *Transplantation* **89**, 994–1000 (2010).
75. Kovarik, J. M. *et al.* Blood concentrations of everolimus are markedly increased by ketoconazole. *J Clin Pharmacol* **45**, 514–528 (2005).
76. Floren, L. C. *et al.* Tacrolimus oral bioavailability doubles with coadministration of ketoconazole. *Clin Pharmacol Ther* **62**, 41–49 (1997).
77. Foradori, A., Mezzano, S., Videla, C., Pefaur, J. & Elberg, A. Modification of the pharmacokinetics of cyclosporine A and metabolites by the concomitant use of Neoral and diltiazem or ketoconazol in stable adult kidney transplants. *Transplant Proc* **30**, 1685–1687 (1998).
78. Gomez, D. Y., Wacher, V. J., Tomlanovich, S. J., Hebert, M. F. & Benet, L. Z. The effects of ketoconazole on the intestinal metabolism and bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* **58**, 15–19 (1995).
79. Hashi, S. *et al.* Assessment of four methodologies (microparticle enzyme immunoassay, chemiluminescent enzyme immunoassay, affinity column-mediated immunoassay, and flow injection assay-tandem mass spectrometry) for measuring tacrolimus blood concentration in Japanese liver transplant recipients. *Transplant Proc* **46**, 758–760 (2014).
80. Dasgupta, A. Endogenous and exogenous digoxin-like immunoreactive substances: impact on therapeutic drug monitoring of digoxin. *Am J Clin Pathol* **118**, 132–140 (2002).
81. Rostaing, L. *et al.* Falsely elevated whole-blood tacrolimus concentrations in a

kidney-transplant patient: potential hazards. *Transpl Int* **23**, 227–230 (2010).

82. Homma, M., Tomita, T., Yuzawa, K., Takada, Y. & Kohda, Y. False positive blood tacrolimus concentration in microparticle enzyme immunoassay. *Biol Pharm Bull* **25**, 1119–1120 (2002).
83. Gunther, M., Saxinger, L., Gray, M. & LeGatt, D. Two suspected cases of immunoglobulin-mediated interference causing falsely low vancomycin concentrations with the Beckman PETINIA method. *Ann Pharmacother* **47**, (2013).
84. Hirata, K. *et al.* Possible false-negative results on therapeutic drug monitoring of phenytoin using a particle enhanced turbidimetric inhibition immunoassay in a patient with a high level of IgM. *Ther Drug Monit* **36**, 553–555 (2014).
85. Haouala, A. *et al.* Therapeutic Drug Monitoring of the new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**, 1982–1996 (2009).
86. Merienne, C. *et al.* High throughput routine determination of 17 tyrosine kinase inhibitors by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* **150**, 112–120 (2018).
87. Andriamanana, I., Gana, I., Duretz, B. & Hulin, A. Simultaneous analysis of anticancer agents bortezomib, imatinib, nilotinib, dasatinib, erlotinib, lapatinib, sorafenib, sunitinib and vandetanib in human plasma using LC/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **926**, 83–91 (2013).
88. Reis, R. *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for therapeutic drug monitoring of the EGFR inhibitors afatinib, erlotinib and osimertinib, the ALK inhibitor crizotinib and the VEGFR inhibitor nintedanib in human plasma from non-small cell lung cancer patients. *J Pharm Biomed Anal* **158**, 174–183 (2018).
89. Bukanov, N. O., Smith, L. A., Klinger, K. W., Ledbetter, S. R. & Ibraghimov-Beskrovnaya, O. Long-lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine. *Nature* **444**, 949–952 (2006).
90. MacCallum, D. E. *et al.* Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res* **65**, 5399–5407 (2005).
91. Karapirli, M. *et al.* Simultaneous determination of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus, and everolimus in whole-blood samples by LC-MS/MS. *ScientificWorldJournal* **2012**, (2012).
92. Sierra-Paredes, G. & Sierra-Marcuño, G. Ascomycin and FK506: Pharmacology and therapeutic potential as anticonvulsants and neuroprotectants. *CNS*

Neuroscience and Therapeutics vol. 14 36–46 Preprint at https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2008.00036.x (2008).

93. Wu, Y. *et al.* Covalent Binding Mechanism of Furmonertinib and Osimertinib With Human Serum Albumin. *Drug Metab Dispos* **51**, 8–16 (2023).
94. Sharifi-Rad, J. *et al.* Probiotics: Versatile Bioactive Components in Promoting Human Health. *Medicina (B Aires)* **56**, 433 (2020).
95. Ohtsu, T., Haruma, K., Ide, Y. & Takagi, A. The Effect of Continuous Intake of Lactobacillus gasseri OLL2716 on Mild to Moderate Delayed Gastric Emptying: A Randomized Controlled Study. *Nutrients* **13**, 1852 (2021).
96. Wang, Z. *et al.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* **472**, 57–65 (2011).
97. Howitt, M. R. & Garrett, W. S. A complex microworld in the gut: gut microbiota and cardiovascular disease connectivity. *Nat Med* **18**, 1188–1189 (2012).
98. Van De Steeg, E. *et al.* An Ex Vivo Fermentation Screening Platform to Study Drug Metabolism by Human Gut Microbiota. *Drug Metab Dispos* **46**, 1596–1607 (2018).
99. Zimmermann, M., Zimmermann-Kogadeeva, M., Wegmann, R. & Goodman, A. L. Separating host and microbiome contributions to drug pharmacokinetics and toxicity. *Science (1979)* **363**, eaat9931 (2019).
100. Lee, J. R. *et al.* Gut microbiota and tacrolimus dosing in kidney transplantation. *PLoS One* **10**, e0122399 (2015).
101. Guo, Y. *et al.* Commensal Gut Bacteria Convert the Immunosuppressant Tacrolimus to Less Potent Metabolites. *Drug Metab Dispos* **47**, 194–202 (2019).
102. Geller, L. T. *et al.* Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science (1979)* **357**, 1156–1160 (2017).
103. Panebianco, C., Andriulli, A. & Pazienza, V. Pharmacomicrobiomics: exploiting the drug-microbiota interactions in anticancer therapies. *Microbiome* **6**, 92 (2018).
104. Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* **48**, 452–458 (2013).
105. Iwasaki, K. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet* **22**, 328–335 (2007).
106. Dinos, G. P. The macrolide antibiotic renaissance. *Br J Pharmacol* **174**, 2967–2983 (2017).
107. Kuno, T., Hirayama-Kurogi, M., Ito, S. & Ohtsuki, S. Effect of Intestinal Flora on Protein Expression of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in the Liver and Kidney of Germ-Free and Antibiotics-Treated Mice. *Mol Pharm* **13**, 2691–

2701 (2016).
108. Toda, T. *et al.* Intestinal flora induces the expression of Cyp3a in the mouse liver. *Xenobiotica* **39**, 323–334 (2009).

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して、終始温かい御指導と激励を賜りました九州大学大学院薬学府臨床薬物治療学 家入一郎教授に謹んで深甚なる感謝の意を表します。また、本論文をまとめるにあたり、種々の有益な御助言と御指導を賜りました九州大学大学院薬学研究院グローカルヘルスケア分野 小柳悟教授、九州大学大学院薬学研究院臨床薬物治療学分野 廣田豪准教授、九州大学大学院薬学研究院臨床育薬学分野 小林大介講師に謹んで感謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり、多くの御指導と御助力を賜りました和歌山県立医科大学医療薬剤学分野 江頭伸昭教授、九州大学病院薬剤部 山本奈々絵先生、福田未音先生に厚く御礼申し上げます。本研究に対し温かい御支援、御協力、多くの御理解をいただきました九州大学病院薬剤部の先生方に心より感謝したします。

また、共同研究を快く引き受けていただき、多くの御助力を賜りました久留米大学医学部医学科感染医学講座 小椋義俊教授、山本武司講師に深甚なる謝意を表します。