

医薬品－微生物間相互作用の解明を目的とした医薬品－ 品－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 :

医薬品—微生物間相互作用の解明を目的とした
医薬品—斉分析系の構築と実践

(分野名) 臨床薬物治療学分野 (学籍番号) 3PS16106Y (氏名) 土谷 祐一

【目的】

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が関連するとして多くの研究が行われている。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。2019年、Zimmermann¹⁾らがヒト腸内細菌叢由来の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、従来考えられていた以上に多くの医薬品が細菌によって分解される可能性が示されたことをきっかけに、腸内細菌が医薬品に与える影響について一層注目が集まっている。

既報のほとんどが糞便中の細菌を用いる *ex vivo* 系にて医薬品の代謝を評価しているが²⁾、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³⁾ことから、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。しかし、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⁴⁾もあることから、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、医薬品の効果を落とすことのない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的とした。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投与量の管理が難しく、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に、整腸剤・発酵食品由来細菌による医薬品の代謝活性の評価を行った。また、代謝活性の評価に際して、液体クロマトグラフィータンデム質量法 (LC-MS/MS) を用いた医薬品の斉分析系を構築し、そのバリデーションを行った。

【方法】

第一章では LC-MS/MS を用いて 12 種類の経口分子標的薬 (アフアチニブ、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) の血漿における斉分析系の構築、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) の全血における同時分析系の構築を行った。両分析系ともエレクトロスプレーイオン化法でイオン化を行い、ポジティブモードによる多重反応モニタリングで検出を行った。

12 種類の経口分子標的薬に対して 1 種類のみ内部標準物質 (IS) を用いた内標準法にて測定を行った。測定範囲は添付文書を参考に、1 - 200 ng/mL、5 - 1000 ng/mL、25 - 5000 ng/mL のいずれかに設定した。50 μ L の血漿を用いてメタノールを用いた簡易なタンパク沈殿法により前処理を行い、遠心後の上清を LC-MS/MS で分析した。

免疫抑制薬の範囲は臨床応用を想定し、タクロリムス、エベロリムスともに 1 - 40 ng/mL に設定した。タクロリムスの IS としてアスコマイシンを、エベロリムスの IS としてエベロリムス-d4 を使用した。全血 180 μ L 溶血させたのちに固相に負荷し、固相抽出を行い、抽出液を LC-MS/MS で分析した。

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⁵⁾に基づき、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実施した。

第二章では医薬品-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、検討を行った。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、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、イマチニブを選択した。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。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、それぞれから微生物を単離、培養し、解析に用いた。スクリーニングでは薬物の最終濃度が 1 μ g/mL となるように brain heart infusion (BHI) 培地に薬物を添加し、各細菌株の一晚培養液を加えて 37°C で 24 時間培養した。培養後の培養上清中の薬物濃度を LC-MS/MS で定量した。比較対象として細菌を接種せずに同条件で培養した薬物入り BHI 培地の残存薬物濃度を 100% として各細菌接種時の薬物の残存率を算出した。スクリーニングで大幅な残存率の低下を見せた *Bacillus subtilis* に着目し、消失機構の解明を目的として、培養上清、溶菌液画分、破砕片画分、溶菌液全体に分画し、それぞれの画分を添加した際の培地の薬物残存率を調べた。また菌による代謝産物の推定を目的として、タクロリムスのヒト主要代謝物の標品を用いた定性の他、質量分析計のスキアンモードを用いた網羅的な探索を行った。

【結果】

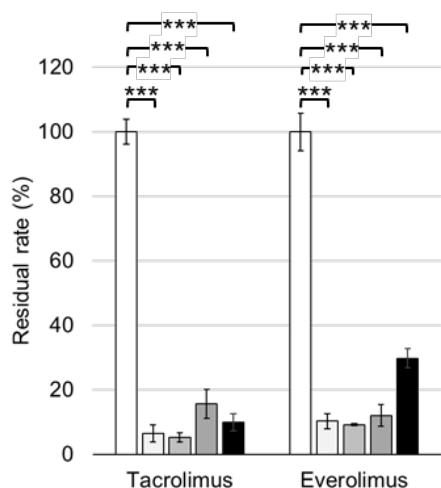
第一章 LC-MS/MS を用いた医薬品の一斉分析系の構築

12 種類の経口分子標的薬の一斉分析系、免疫抑制薬の同時分析系ともに設定した測定範囲において良好な直線性を示し、ガイドラインを満たす精度と真度であることから測定値の再現性が高いことが示された。またブランクサンプルを用いた選択性の評価を行い、タクロリムスを除く薬物において干渉するピークは観測されなかった。タクロリムスでは干渉するピークが観測されたものの、認められたピークは定量下限のレスポンスの 20%以下であったことから、ガイドラインの許容水準内であった。ブランクマトリックスを用いた回収率とマトリックスファクターの検討では、経口分子標的薬の一斉分析系において両項目共にガイドラインの許容水準を満たした。一方で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変動係数がガイドラインの許容水準である 15% を上回る値となり、ガイドラインの許容水準を満たすためにはそれぞれに対して適切な IS の選択・補正が必要であった。また安定性試験の結果から、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。

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

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 および *Clostridium butyricum* は、免疫抑制薬であるタクロリムスならびに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 *Bacillus subtilis* TO-A 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 (図 A)。薬物の消失に関連する因子の、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、タクロリムスならびにエベロリムスの残存率低下は複数の因子が関与していること、中でも菌体外に分泌される因子の寄与が最も大きいことが示唆された。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 (図 B および C)。

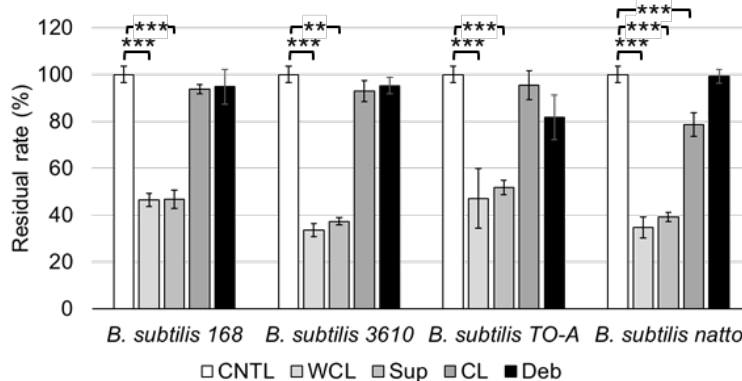
A) Effect of *Bacillus subtilis* on the residual rate of tacrolimus and everolimus



□ Control
 □ *B. subtilis* 168
 □ *B. subtilis* 3610
 □ *B. subtilis* TO-A from Bio-three
 ■ *B. subtilis* natto

CNTL, control;
 WCL, whole cell lysate;
 Sup, supernatant fraction;
 CL, soluble cell lysate fraction;
 Deb, insoluble or cell debris fraction;
B. subtilis, *Bacillus subtilis*.
 ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

B) Effect of bacterial fraction on residual rate of tacrolimus



C) Effect of bacterial fraction on residual rate of everolimus

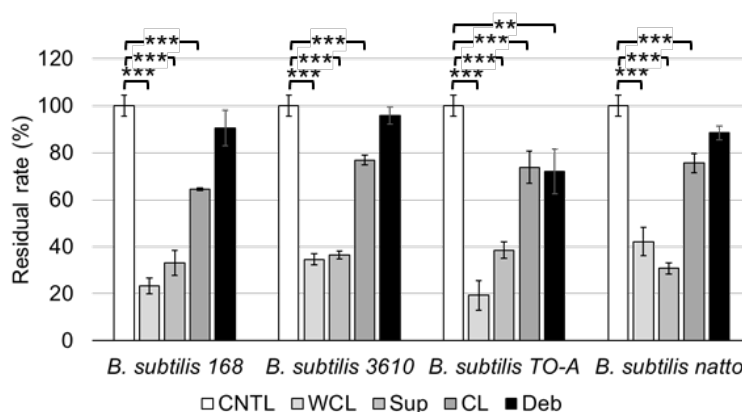


図 *Bacillus subtilis*によるタクロリムスおよびエベロリムスの代謝

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約 8% は生きたまま回腸まで到達するという報告⁴⁾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。

【考察】

第一章で構築した 2 つの分析系は米国食品医薬品局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、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た。したがって、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。

第二章で得られた一連の結果と外部から摂取した細菌の一部は生きたまま回腸まで到達するという報告⁴⁾から、納豆または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。

【引用論文】

- 1) 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).
- 2) Ladirat SE, Schols HA, Nauta A, Schoterman MH, Keijser BJ, Montijn RC, Gruppen H, Schuren FH. High-throughput analysis of the impact of antibiotics on the human intestinal microbiota composition. *J Microbiol Methods* 92, 387–397 (2013).
- 3) Sekirov, I., Russell, S. L., Caetano M Antunes, L. & Finlay, B. B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90, 859–904 (2010).
- 4) Takada T, Chinda D, Mikami T, Shimizu K, Oana K, Hayamizu S, Miyazawa K, Arai T, Katto M, Nagara Y, Makino H, Kushiro A, Oishi K, Fukuda S. 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).
- 5) Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry | FDA. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.

【発表論文】

Tsuchiya Yuichi, Suetsugu Kimitaka, Yamamoto Nanae, Kobayashi Daisuke, Tsuji Toshikazu, Watanabe Hiroyuki, Egashira Nobuaki, Masuda Satohiro. (2019) Simultaneous determination of plasma concentration of 12 oral molecular-targeted drugs by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Jap J Ther Drug Monit*, 36 (3): 105-116 (2019).