

代謝物測定に関する Regulatory Science

(株式会社 JCL バイオアッセイ¹)

○戸塚善三郎¹

Current Topics of Regulatory Science for Analysis of Drug Metabolites

(JCL Bioassay Co.¹)

○Z.Tozuka¹

Short Abstract: Safety Testing of Drug Metabolites (FDA Guidance June 2005) that metabolites identified in human plasma that account for greater than 10 percent of drug related (administered dose or systemic exposure whichever is less) in the case of unique human metabolite or metabolite presented at much higher levels in human than in the animals used during standard toxicity testing, need four kinds of safety studies such as General Toxicity, Genotoxicity, Embryo-Fetal Development and Carcinogenicity. We can measure unique human metabolite or major metabolite in the microdose clinical study in early stage of drug development by LC/MS. Microdose Clinical Studies (EU Guidance 2003) and Exploratory IND studies (FDA Guidance 2006) are current topics of regulatory Science because Japanese Version will be published near future.

Keywords: Regulatory Science, Drug Metabolites, Toxicity Studies, Microdose

臨床試験でヒト特有の薬物代謝物がみつかることがある。ヒト肝ミクロソームやヘパトサイトの *in vitro* 代謝反応ではみつからなかった薬物代謝物が臨床試験でみつかることがある。代謝の種差、CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 の酵素が遺伝的に欠損している Poor Metaboliser と Extensive Metaboliser の比率が異なる人種差および SNIP の個体差、酵素誘導による血中濃度低下、酵素阻害による血中濃度の上昇など薬物相互作用、アシルグルクロナイドのような毒性の起因となる活性代謝物になる薬物など、薬物の代謝物測定は重要である。

「Safety Testing of Drug Metabolites」 FDA Draft Guidance, June 2005

ヒト特有の薬物代謝物、或いは、動物よりヒトでの比率が高い薬物代謝物が投与量あるいは全身暴露量（未変化体と代謝物の AUC の総和）の 10%を超える場合は、その代謝物を投与する 4 種類の毒性試験が必要である。1) 代謝物を投与する一般毒性試験 (TK を含む 14-90 日間投与試験)、2) 遺伝毒性試験 (2 *in vitro*: point mutation and aberration)、3) 癌原性試験、4) 胚・胎児発生毒性試験。最近実施されている TK 測定や臨床試験の PK 測定では代謝物の同時測定が一般的に実施されている。動物での薬物代謝物の比率がヒトでの薬物代謝物の比率を上回れば通常の毒性試験で代謝物の安全性が担保されている。従来の医薬品開発では臨床試験段階に進めばゴールかドロップであり、ヒトの *in vivo* 代謝物は臨床試験を実施してみないと分からなかった。

「Exploratory IND Studies」FDA Guidance, January 2006、EU の「Position Paper (2003)」が既に法規制し、現在日本の当局が準備中のマイクロドーズ臨床試験は医薬品の初期の開発段階で実施される。高感度濃度測定法の LC/MS では未変化体及びヒト *in vivo* 代謝物を測定できる。非臨床試験用動物の *in vivo* 代謝物と比較検討し実験動物種の選択を的確にすれば、Safety Testing of Drug Metabolites は回避できる。規制の倫理性・科学性を鑑み臨床試験の計画的戦略を的確に企画実行すれば医薬品開発時間の短縮・コストの削減ができ、患者に代謝に関する諸問題の安全性を保証したより良い薬物を提供できる。マイクロドーズ臨床試験における投与量の上限は予想臨床投与量(薬効量)の100分の1未満か $100 \mu\text{g}/\text{man}/\text{day}$ 以下の低い方の投与量である。「拡張型単回投与毒性試験」(1動物種、1試験)を実施し、投与の1日後と14日後の2回、血液化学的検査や病理組織学的検査を実施する。明白な毒性が認められる用量、EU は1000倍(FDA 100倍)の安全域が必要である。マイクロドーズ臨床試験での高感度血中濃度測定機器としては LC/MS/MS PET, AMS がある。LC/MS/MS の特徴はMD試験の微量血漿中濃度の高感度定量分析が可能であり proof of concept (POC)を保証する PK/PD を AUC・Cmax の線形性から推定する。LC/MS/MS の特徴は微量代謝物の構造解析が可能で *in vivo* ヒト特有代謝物の有無、活性代謝物の有無、代謝の種差・CYP1A2, 2C19, 2D6 の人種差等を調べる。LC/MS/MS の特徴は Hot 標識体を必要としないので初期開発候補品の MD試験の分析法に適する。「日本初のマイクロドーズレベルの臨床試験」について、2006年第54回質量分析総合討論会で私は北里大学医学部熊谷雄治先生、東大杉山先生、馬屋原先生と一緒に企画・実施し発表した。Fexofenadine マイクロドーズ($100 \mu\text{g}$ 溶液)と臨床用量(60mg 錠剤)のランダム化オープンクロスオーバー試験を健常成人男子8名を対象に実施した。測定は現在使用されている A, T, W 3社の10機種 of TSQ LC/MS/MS の検出限界を測定した結果、 $1\text{pg} - 0.0005\text{pg}$ の感度差があった(0.1pg の機種が多かった)。最高感度の UPLC/ESI/API5000 MS/MS 装置で測定した。Fexofenadine のプロトン化分子 $m/z502$ と MS/MS のプロダクトイオン $m/z466$ (ベースイオン) の SRM 測定の定量法を確立した。ヒト血漿中 Fexofenadine の下限定量限界は $10\text{pg}/\text{mL}$ であった。Fexofenadine マイクロドーズ($100 \mu\text{g}$ 溶液)の血漿中濃度の Cmax の平均は $632\text{pg}/\text{mL}$, AUC の平均は $3189\text{pg} \cdot \text{hr}/\text{mL}$ であり線形性はほぼ保たれている。次に微量代謝物の構造解析を高感度の linear Ion Trap MS LTQ と高分解能の FT ICR MS のハイブリッド MS の LTQ FT MS でおこなった。文献どおり Fexofenadine 臨床用量・マイクロドーズでも代謝物がないことを確認した。我々のグループは更に数十回のマイクロドーズ試験を予定しておりヒトの *in vivo* 代謝物の構造解析を予定している。