

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第 695 号	氏名	炭本隆宏
審査委員会委員	主査氏名	谷川 雅人	
	副査氏名	北野 敬明	
	副査氏名	木許 賢一	
論文題目			
<p>Development of a Sensitive and High-Throughput Assay for Simultaneous Quantification of 5 Tyrosine Kinase Inhibitors and 2 Active Metabolites in Human Plasma Using Ultra-high Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (超高速高分離液体クロマトグラフタンデム型質量分析機を用いたヒト血漿中のチロシンキナーゼ阻害薬 5 種および活性代謝物 2 種の高感度かつハイスループットな同時測定法の確立)</p>			
論文掲載雑誌名 Therapeutic Drug Monitoring			
論文要旨			
<p>様々ながん種に対して適応をもつ経口分子標的薬の中でも BCR-ABL チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) は、慢性骨髄性白血病 (CML) の治療において、予後を改善するばかりではなく、これまでの入院による治療から外来での治療を可能とした。しかし、BCR-ABL TKI による治療にもかかわらず、十分な治療効果が得られない、または副作用により服用継続を中断せざるを得ない患者が存在する。本研究では、固相抽出法と超高速高分離液体クロマトグラフタンデム型質量分析 (UHPLC-MS/MS) を組み合わせた定量法によって、5 種の BCR-ABL TKI (イマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ、ボスチニブ、ポナチニブ) と 2 種の活性代謝物 (N-デスメチル-イマチニブ、N-デスメチル-ポナチニブ) における同測定法のハイスループットかつ高感度な同時定量法を確立した。</p> <p>血漿サンプルの前処理には Oasis® MCX µElution plate を用いた固相抽出法を選択し、C18 カラムを用いて UHPLC-MS/MS 法により測定した。また、確立した定量法を用いて CML 患者 26 例における各 BCR-ABL TKI および活性代謝物の血漿中濃度を測定した。</p> <p>各 BCR-ABL TKI および活性代謝物の保持時間は 2-3 分の範囲にあり、6 分/検体の短時間で測定可能であった。前処理に µElution plate を導入することで同時に最大 96 サンプルの固相抽出が可能となり、ハイスループットな処理が可能となった。検量線範囲は、5 種の BCR-ABL TKI と 2 種の活性代謝物において、高感度かつ幅広い範囲で良好な直線性を確認できた。また、回収率および Matrix effect はともに問題なく、妨害ピークは確認されず十分な特異性を確認できた。また、CML 患者における血漿中濃度の測定では、既報では検出が困難であったダサチニブのトラフ濃度を含め、全ての検体においていずれの BCR-ABL TKI および活性代謝物の血漿中濃度は検量線範囲内であった。</p> <p>本研究は、5 種の BCR-ABL TKI および 2 種の活性代謝物の高感度同時測定法は臨床応用が可能である方法を確認したものであり、BCR-ABL TKI の血漿中濃度と有効性および副作用発現との関連性を示すエビデンスの構築に大変有用な研究である。</p> <p>このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第695号	氏名	炭本隆宏
審査委員会委員	主査氏名	谷川 雅人	
	副査氏名	北野 敬明	
	副査氏名	木許 賢一	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. マトリックスの成分およびその測定結果におよぼす効果はどのようになるのか。 2. 活性代謝物の中で2種だけを測定している理由。 3. 前処理としての固相抽出とLCの詳細と臨床における実用時の利用方法。 4. TKIsが血中濃度を測定することが治療効果を判定するのに有用である理由 5. UHPLCとMS/MSとの測定時の接続・処理方法について。 6. 内標準物質に重水素標識化合物を使用して検量する過程について。 7. BCR-ABL TKIは改変されてかなり特異性が高いように思えるが、いまだに副作用が多い理由は何故か。 8. 当院で実際に治療変更・中止を余儀なくされる患者さんはどの程度存在するか。 9. 血漿を-40℃保存する理由は。 10. マトリックス効果が見られた場合にはどのような擬似マトリックスの添加を考えられていたのか。 11. トラフ濃度を測定する理由と各薬剤の濃度変化はどのように考えるのか。 12. PDGFR, c-kit遺伝子を抑制することにより出現する可能性のある副作用について 13. 各薬剤の投与量と各薬剤の分子量との関連性について 14. この測定系で測定できる濃度下限について。 15. 従来のTDMはどの方法を用いていたのか。本方法を使用することで実際の労力は軽減できているか。 16. LLE法と比較してどの程度ランニングコストが高くなるのか。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 炭本 隆宏

論 文 題 目

Development of a Sensitive and High-Throughput Assay for Simultaneous Quantification of 5 Tyrosine Kinase Inhibitors and 2 Active Metabolites in Human Plasma Using Ultra-high Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry

(超高速高分離液体クロマトグラフタンデム型質量分析機を用いたヒト血漿中のチロシンキナーゼ阻害薬 5 種および活性代謝物 2 種の高感度かつハイスループットな同時測定法の確立)

要 旨

【緒言】近年、様々ながん種に対して適応をもつ経口分子標的薬が登場している。中でも BCR-ABL チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) の登場は、慢性骨髄性白血病 (CML) の治療において、予後を改善するばかりではなく、これまでの入院による治療から外来での治療を可能にした。しかし、BCR-ABL TKI による治療にもかかわらず、十分な治療効果が得られない、または副作用により服用継続を中断せざるを得ない患者が存在する。治療薬物モニタリングを利用した治療戦略はこのような問題を解決できる一つのツールとして活用できると考えられており、現在まで BCR-ABL TKI の血漿中濃度と有効性や副作用発現との関連性を示す報告が多くされている。一方で、日常業務の中で様々な薬物の血漿中濃度を測定し、その臨床評価やエビデンス構築に寄与するためには、より高感度かつ迅速で簡便な同時測定法の確立が求められる。固相抽出法と超高速高分離液体クロマトグラフタンデム型質量分析

(UHPLC-MS/MS) を組み合わせた定量法は、このような問題を解決できる方法の一つと考えられるが、5種の BCR-ABL TKI (イマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ、ボスチニブ、ポナチニブ) と2種の活性代謝物 (N-デスメチル-イマチニブ、N-デスメチル-ポナチニブ) における同測定法の報告はされていない。このような背景のもと、本研究では、固相抽出法と UHPLC-MS/MS を組み合わせた5種の BCR-ABL TKI と2種の活性代謝物のハイスループットかつ高感度な同時定量法の確立を目的とした。

【方法】 血漿サンプルの前処理には Oasis® MCX μ Elution plate を用いた固相抽出法を選択し、C18 カラムを用いて UHPLC-MS/MS 法により測定した。内標準物質には、各種 BCR-ABL TKI および活性代謝物の重水素体を使用した。アメリカ食品医薬品局の生体試料中薬物濃度分析に関するガイダンスに準拠したフルバリデーションを実施し、本測定系の妥当性を評価した。また、確立した定量法を用いて CML 患者 26 例における各 BCR-ABL TKI および活性代謝物の血漿中濃度を測定した。

【結果・考察】 各 BCR-ABL TKI および活性代謝物の保持時間は 2-3 分の範囲にあり、6 分/検体の短時間で測定可能であった。前処理に μ Elution plate を導入することで同時に最大 96 サンプルの固相抽出が可能となり、ハイスループットな処理が可能となった。検量線範囲は、イマチニブとニロチニブは 2.5-2500 ng/mL、N-デスメチル-イマチニブとボスチニブ、ポナチニブは 0.5-500 ng/mL、N-デスメチル-ポナチニブは 0.3-300 ng/mL、ダサチニブは 0.2-200 ng/mL であり、高感度かつ幅広い範囲で良好な直線性を確認できた。日内・日間変動も、良好な再現性および正確性が認められ、回収率および Matrix effect はともに問題なく、妨害ピークは確認されず十分な特異性を確認できた。また、CML 患者における血漿中濃度の測定では、既報では検出が困難であったダサチニブのトラフ濃度を含め、全ての検体においていずれの BCR-ABL TKI および活性代謝物の血漿中濃度は検量線範囲内であった。

【結語 (まとめ)】 本研究で確立した5種の BCR-ABL TKI および2種の活性代謝物の高感度同時測定法は臨床応用が可能であり、BCR-ABL TKI の血漿中濃度と有効性および副作用発現との関連性を示すエビデンスの構築に寄与できると考えられる。