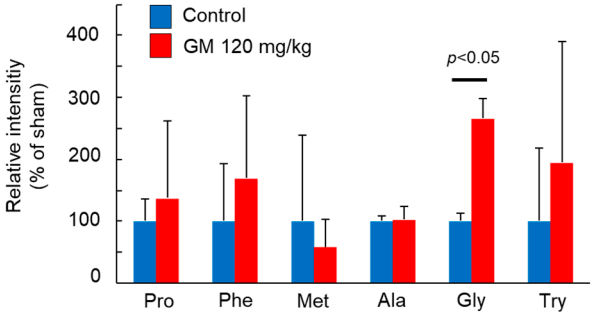
100　薬物の副作用の早期発見を目指したbiomarker探索研究	松元　一明

【目的】薬物の使用により副作用が発現すると、治療の継続が困難になったり、後遺症が残ったり、死に至るケースがある。そのため医療従事者は、副作用の発現を最小限に抑えるため、患者状態、臨床検査値等をモニタリングし、副作用の早期発見に努める必要がある。しかし既存の臨床検査値では、組織障害が発現してから指標の数値が変動するまで、タイムラグがあり、副作用の早期発見に繋がらないケースがある。近年、疾患と蛋白質断片（ペプチド）の発現や濃度変動、または、アミノ酸の濃度変動との関係が検討され、疾患の biomarker として、ペプチドやアミノ酸が注目されている。これらのペプチドは、様々な疾患で特徴的に増減することから、疾患の有無や進行度の判断、治療効果の判定における biomarker として期待されている。しかし、薬物による副作用の判定に、ペプチドやアミノ酸を biomarker として検討されている研究はない。そこで、薬物の副作用の早期発見を目指して、既存の指標よりも迅速かつ正確な biomarker（ペプチド、アミノ酸）を探索することを目的として研究を実施する。薬物は、臨床での使用頻度、ならびに、副作用の発現頻度が高いアゾール系抗真菌薬による肝障害、アミノグリコシド系抗菌薬による腎障害、ダプトマイシンによる横紋筋融解症、ニューキノロン系抗菌薬による血糖異常をターゲットにペプチドの発現、濃度変動、アミノ酸の濃度変動を調査する。さらに、薬物の投与前のペプチドやアミノ酸濃度と副作用発現の関係を検討し、副作用発現のリスクファクターとなるペプチドやアミノ酸を同定する。また、薬物の副作用発現に関わるペプチドから蛋白質を同定し、副作用の発現機序ならびに副作用の発現を予防できる薬物の開発に繋げたいと考えている。

【方法】アミノ酸の測定は、蛍光誘導体化試薬である DBD-PyNCS を用いた検出方法を用いた。アミノ酸を DBD-PyNCS により誘導体化し、液体クロマトグラフ質量分析法（LC-MS）による各アミノ酸の検出を行った。動物実験モデルとしては急性腎障害モデルラット用いた。ラットに、アミノグリコシド系抗菌薬であるゲンタマイシンを 120 mg/kg で腹腔内投与し、急性腎障害モデルラットを作製した。モデル作製の指標には既存の臨床検査値として血清クレアチニン（sCr）、血中尿素窒素（BUN）を用いた。薬物投与後、経時的に採血を行い、各種アミノ酸を LC-MS により測定した。既存の臨床検査値と各種アミノ酸の相関関係を確認し、biomarker の候補を探索するとともに既存の腎障害マーカーよりも早期から診断可能な biomarker について検討した。

【結果】LC-MS を用いたアミノ酸の同時検出方法について検討した結果、高感度に検出が可能なアミノ酸はプロリン、メチオニン、フェニルアラニン、アラニン、グリシン、チロシンの 6 種類であった。次に薬剤性の副作用モデルとして、ゲンタマイシン誘発急性腎障害モデルラットを作製し、既存の腎障害マーカーである sCr、BUN との比較検討を行った。ラットにゲンタマイシンを 120 mg/kg で連日腹腔内投与した結果、sCr、BUN は投与 5 日目まではコントロール群と比較して差はみられないものの、8 日目において有意に上昇した。投与 8 日目において、既存の腎障害マーカーの上昇がみられたため、ゲンタマイシン投与 8 日目における血中アミノ酸濃度変動について検討した結果、グリシンについては control 群と比較して有意に上昇していることが確認された。そこで、これら既存の腎障害マーカーによる腎障害が認められない、ゲンタマイシン投与 3 日目以前における血中アミノ酸濃度変動について検討した結果、これらアミノ酸の変動は認められなかった。今後、さらに検出条件を検討し、他のアミノ酸変動について解析を行うとともに、ペプチドや他のアミノ酸関連代謝物の変動についても解析を進める予定である。

ゲンタマイシン誘発腎障害モデルラットにおけるアミノ酸変動



100. 薬物の副作用の早期発見を目指したbiomarker探索研究

松元　一明

慶應義塾大学 薬学部 薬効解析学講座

Key words：薬剤性副作用，biomarker，液体クロマトグラフ質量分析計，ペプチド，アミノ酸

緒　言

薬物の使用により副作用が発現すると、治療の継続が困難になったり、後遺症が残ったり、死に至るケースがある。そのため医療従事者は、副作用の発現を最小限に抑えるため、患者状態、臨床検査値等をモニタリングし、副作用の早期発見に努めている。私はこれまで、薬物による副作用の発現を回避するための研究に従事し、バンコマイシン、リネゾリド、アムホテリシン B、ボリコナゾール、ガンシクロビルの副作用発現に関わるリスクファクターを、多変量解析やロジスティック回帰分析により同定した。さらに、薬物の使用による *Clostridium difficile* 感染症やB型肝炎ウイルス再活性化のリスクファクターについて示した。また、テイコプラニン、リネゾリド、ボリコナゾールはtherapeutic drug monitoring（TDM）に基づき、薬物血中濃度と有効性および副作用発現の関係（pharmacokinetics/pharmacodynamics（PK／PD）解析）から、有効性を担保しつつ、副作用の発現を回避できる有効血中濃度域を同定し、母集団薬物動態解析より、患者個々に応じた最適投与法を構築した。これらの研究成果は、臨床応用に至り、治療中止や副作用発現の減少に繋がっている。しかし、副作用をすべて回避することは不可能である。したがって、副作用による治療中止、後遺症、死亡を回避するためには、出来る限り早期に副作用を発見するための指標を見出す必要がある。例えば、現在使用されている腎障害の指標に血清クレアチニン値がある。これは、クレアチニンクリアランスが 50 mL/min 以下（中等度腎障害）まで低下しないと上昇しない。このように、既存の臨床検査値では、組織障害が発現してから指標の数値が変動するまで、タイムラグがあり、副作用の早期発見に繋がらないケースがある。

近年、疾患と蛋白質断片（ペプチド）の発現や濃度変動、または、アミノ酸の濃度変動との関係が検討され、疾患のbiomarkerとして、ペプチドやアミノ酸が注目されている。ペプチドーム解析では、血液中あるいは組織中の蛋白質が疾患特異的プロテアーゼ群により分解されて産生するペプチドの中から、健常者と患者、疾患の重症度、薬物による治療前後で、その量が変化する一群のペプチドが見出されている。これらのペプチドは、様々な疾患で特徴的に増減することから、疾患の有無や進行度の判断、治療効果の判定におけるbiomarkerとして期待されている。しかし、薬物による副作用の判定に、ペプチドをbiomarkerとして検討されている研究はない。一方、疾患とアミノ酸の関係では、ラットの急性肝障害モデルで、血液中のアルギニン濃度が減少すること、ならびに、マウスの急性腎障害時にD-セリン／L-セリン比が血液中で上昇することが報告されている。しかし、薬物による組織障害やヒトを対象とした研究は行われていない。さらに、アミノ酸には、筋肉で代謝されるアミノ酸、筋肉の分解により検出されるアミノ酸があり、薬物による横紋筋融解症が発現すれば、各種アミノ酸濃度が変動する可能性がある。また、アミノ酸は糖新生に関わっているので、薬物による血糖異常時には糖原性アミノ酸の濃度が変動する可能性もある。

そこで、薬物の副作用の早期発見を目指して、既存の指標よりも迅速かつ正確なbiomarker（ペプチド、アミノ酸）を探索することを目的として研究を実施する。薬物は、近年、耐性菌の発現を抑制するために高用量投与が推奨され、副作用のマネジメントが重要なポイントになっている抗微生物薬を対象とする。臨床での使用頻度、ならびに、副作用の発現頻度が高いアゾール系抗真菌薬による肝障害、アミノグリコシド系抗菌薬による腎障害、ダプトマイシンによる横紋筋融解症、ニューキノロン系抗菌薬による血糖異常をターゲットにペプチドの発現、濃度変動、アミノ酸の濃度変動を調査する。さらに、薬物の投与前のペプチドやアミノ酸濃度と副作用発現の関係を検討し、副作用発現のリスクファクターとなるペプチドやアミノ酸を同定する。また、薬物の副作用発現に関わるペプチドから蛋白質を同定し、副作

用の発現機序ならびに副作用の発現を予防できる薬物の開発に繋げたいと考えている。

方　法

1.　液体クロマトグラフ質量分析法（LC-MS）を用いたアミノ酸の同時検出法の検討

各種アミノ酸の検出には蛍光検出試薬である DBD-PyNCS を用いる方法を参考にした［1, 2］。各種アミノ酸標準品水溶液に DBD-PyNCS を添加し、Dimethylaminopyridine 存在下、55℃で 20 分間反応させることで誘導体化した。反応は氷冷下、メタノールーアセトニトリルー水（0.1／20／80）溶液を添加することで停止した。アミノ酸の LC 分離カラムとして HILIC カラム（COSMOSIL 2.5HILIC packed column、2.0 mm I.D.×150 mm、2.5μm、Nacalai Tesque, Kyoto、Japan）を使用した。移動相は、A 液：10 mM ギ酸アンモニウム-メタノール溶液（100／1）、B 液：10 mM ギ酸アンモニウムーメタノールーアセトニトリル（5/1/95）を使用し、次第に A 液比率を上昇させることで同時検出を試みた。装置構成は以下となっている；日立高速液体クロマトグラフ chromaster システムマネージャー、5160 pump、低圧
グラジエントユニット、5440 蛍光検出器、5310 カラムオーブン、5610MS 検出器。蛍光検出器は Ex/Em＝440/565nm にて検出し、同時に MS による検出を行った。

2. 血液サンプル中アミノ酸測定法の検討

健常ラット血漿 90μL に対して、内標準物質の d-Homo Serine（10μL）、メタノール 1,000μL、アセトニトリル 300μL を添加し、30 秒間ボルテックした。その後、2,000×g、4℃条件下で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。回収した上清は 50℃、3 時間蒸発乾固させた。乾固物に対し、LC-MS 用蒸留水 10μL を加えて溶解し、Dimethylaminopyridine 存在下、DBD-PyNCS にて誘導体化した（55℃、20 分）。反応は氷冷下、ギ酸-水-アセトニトリル（0.1／20／80）溶液を添加することで停止した。反応物に対して、アセトニトリルを添加し、InterSep NH2（GL Sciences、Inc., Tokyo、Japan）固相カラムにローディングし、固相抽出を行った。固相カラム溶出物は方法 1. と同様の LC-MS 条件にて測定した。

3. ゲンタマイシン誘発急性腎障害モデルにおけるアミノ酸変動の検討

ゲンタマイシン誘発急性腎障害モデルは過去の報告を参考にし［3, 4］。Sprague-Dawley ラット（雄、6 週齢、体重 200～250 g）にゲンタマイシンを 120 mg/kg/day で 1 日 1 回 6 日間連日腹腔内投与した。コントロール群には生理食塩水を同量投与した。薬物投与 2 日前から食事摂取量、飲水量、尿量をモニタリングした。採血は投与直前、投与 1 日後、3 日後、5 日後、8 日後の 5 点で尾静脈から実施した。血液サンプルは 1,000×g で遠心後、上清を回収し実験まで－80℃で保管した。血中および尿中の Cr および血中 BUN は富士ドライケム 7000 を使用して測定した。

結果および考察

1. LC-MS を用いたアミノ酸の異性体分離と同時検出法の検討

アミノ酸標準品水溶液を用いた各種アミノ酸の分離と同時検出法について検討した。まず、蛍光検出器を用いた LC によるクロマトグラム上では、20 種類のアミノ酸のうち、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸およびグルタミン酸は検出されなかった。またシステインは検出されたもののその感度は極めて低かった。今回使用しているカラムが HILIC カラムであり、triazole-H^+チャージに対して、DBD-PyNCS-amino acid 誘導体の-CO_2^-と相互作用するため、カルボン酸基の多い酸性アミノ酸は溶出時間が遅くなることが知られている［2］。しかしながら今回の条件では溶出が認められなかったことからさらにグラジエント条件を変更する必要があると考えられた。

アスパラギン酸の D 体は神経形成や神経伝達に重要な役割を担うアミノ酸であり、また肝機能マーカーである AST や ALT はアスパラギン酸やアラニンを基質とし、グルタミン酸を産生する。そのため、アスパラギン酸は肝障害やその他の細胞実質障害によって変動する可能性が考えられるため、検出方法については再検討する必要があると考えている。

また、システインは酸性アミノ酸ではないが、-SH が還元性を示すことから存在比率が処理条件下で変動している可能性が考えられた。Sakamoto ら［1, 2］もシステインの検出は示しておらず、今後検討が必要であると考えている。

特にシステインは遊離 SH 基が抗酸化作用を示すことから、腎障害のような酸化ストレスを病態の一要因とする疾患では変動する可能性があるため、還元型と非還元型比率の変動が病態を反映する指標となることも考慮し、今後個別の検出も検討していく予定である。

以上の検討結果を踏まえ、次に健常ラット血漿を用いてアミノ酸の分離検出について検討した。その結果ラット血漿において、LC-MS のいずれにおいても検出されたアミノ酸は、プロリン（Pro）、メチオニン（Met）、フェニルアラニン（Phe）、アラニン（Ala）、グリシン（Gly）、チロシン（Tyr）の 6 種類であった。その他のアミノ酸については MS による検出ができなかった（図 1）。

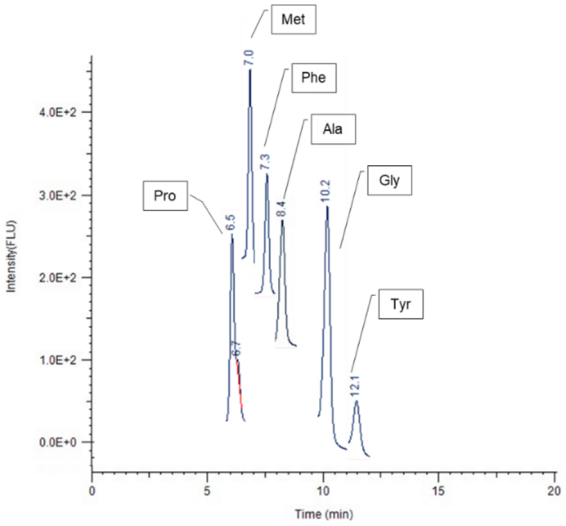


図 1. 各種アミノ酸の標準品の LC ピークスペクトル

アミノ酸標準品および健常ラット血漿のいずれにおいても検出することができたアミノ酸について、その標準品水溶液の LC ピークスペクトラムを示す。各種アミノ酸標準品水溶液の濃度は 100 μM である。

2. ゲンタマイシン誘発急性腎障害モデルにおけるアミノ酸変動の検討

ラットにゲンタマイシンを 120 mg/kg/day で 6 日間連日腹腔内投与を行い、8 日目における sCr および BUN の変化について検討した結果、投与後 5 日目までは両群に有意な差はみられなかったが、投与後 8 日目においてゲンタマイシン投与群で有意な上昇がみられ、腎障害の誘導が確認された（図 2）。

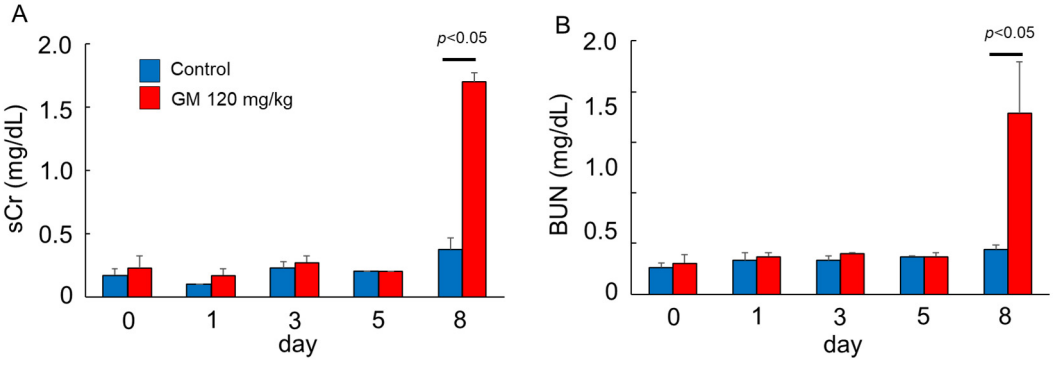


図 2. ゲンタマイシン投与ラットにおける腎障害の経過

ゲンタマイシン（120 mg/kg/day，6 日間連日投与）による腎障害への影響評価。

A） ゲンタマイシン投与が sCr に及ぼす影響。

B） ゲンタマイシン投与が BUN に及ぼす影響。

値は平均値±標準偏差で示した（n = 3）。統計解析は student-t 検定を使用した。

そこで既存の腎障害マーカーにおいて腎障害が認められたゲンタマイシン投与 8 日目におけるアミノ酸変動について検討した。Gly については有意な上昇がみられたが、他のアミノ酸については上昇傾向がみられるものも存在したが、有意な上昇はなかった （図 3B)。次に既存の腎障害マーカーである sCr や BUN においては腎障害の認められない、ゲンタマイシン投与 3 日目における血中アミノ酸濃度変化について検討した結果、いずれのアミノ酸においても有意な差はみられなかった （図 3A)。血中アミノ酸濃度は食事や脱水による血液の濃縮により変動する恐れがある。BUN は脱水によって上昇することが知られているため、脱水の指標としても捉えられるが、今回の検討において、コントロール群と比較してゲンタマイシン投与 5 日目までにおいて変化はみられなかった。また食事摂取量および飲水量をモニタリングしたが、コントロール群とゲンタマイシン群で差はみられなかったことからも、今回見られたゲンタマイシン投与 8 日目における Gly の上昇は、これら食事や脱水の影響ではないと考えられた。Gly は 20 種類のアミノ酸のうち、鏡像異性体を持たないアミノ酸であり、D／L 体の変動はない。また現在までに Gly の腎障害や他の疾患での変動の報告はないことから、今後、詳細な検討を行う必要がある。今後は他のアミノ酸変動についても詳細な検討を実施すべく、アミノ酸の検出条件のさらなる検討が必要だと考えている。

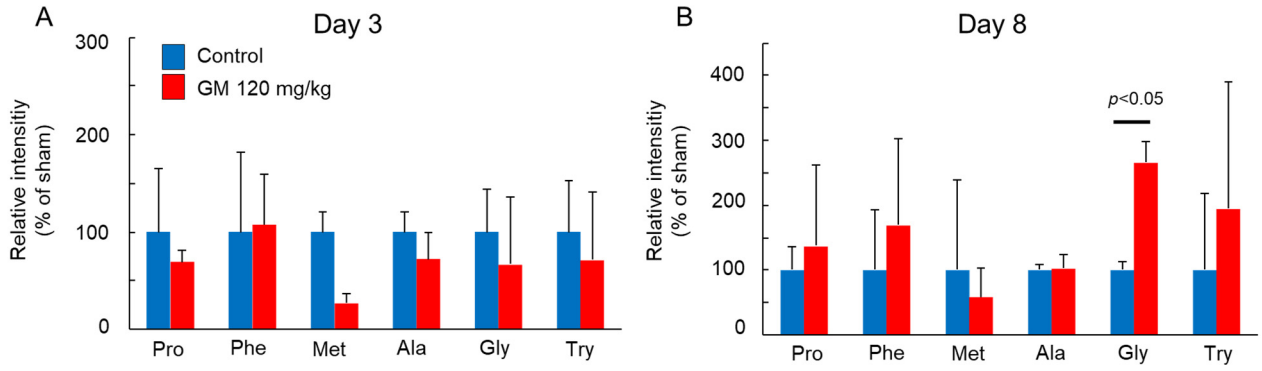


図 3. ゲンタマイシン投与ラットにおける血中アミノ酸濃度変化の検討

ゲンタマイシン（120 mg/kg/day, 6 日間連日投与）による血漿中アミノ酸濃度への影響評価

プロリン （Pro)、メチオニン （Met)、フェニルアラニン （Phe)、アラニン （Ala)、

グリシン （Gly)、チロシン （Tyr)、GM （ゲンタマイシン)。

A) ゲンタマイシン投与 3 日目における血漿中アミノ酸濃度。

B) ゲンタマイシン投与 8 日目における血漿中アミノ酸濃度。

Control 群の値の平均値を 100%とした相対強度で示した。値は平均値±標準偏差で示した（n = 3)。

統計解析は student-t 検定を使用した。

過去の報告において腎障害との関連性が報告されているアミノ酸として D-セリンが知られている［5]。D-セリンは腎障害において上昇するだけでなく、D-セリンの過剰投与によって腎障害が誘発されることが報告されている［6]。今回の検討において、L-セリンならびに D-セリンのいずれもアミノ酸標準品を用いた検討では検出できたが、血漿サンプルを用いた検討においては L-セリンの検出は出来なかった。また D-セリンは L-セリンよりも血漿中濃度は低いため、こちらも検出には至らなかった。今回、アミノ酸標準品を用いた検討において検出できたにも関わらず、血漿サンプルにおいて検出できなかった理由として、検出感度の問題点がある。グリシン、アラニン、チロシン、バリン、ロイシン、グルタミンは比較的高濃度で血中に存在しているが（50～400 μM)、それ以下の濃度のアミノ酸も多く存在する。D 体アミノ酸はそれ以下の濃度である。また、各アミノ酸は個々では検出できたものの、今回のグラジエント条件では、7～15 分の間に多くのアミノ酸が混在しており、血液サンプルを用いて同時検出した場合、MS による検出条件の最適化が不十分であった可能性が考えられる。Sakamoto ら［1, 2］も DBD-PyNCS による誘導体化したアミノ酸の LC-MS／MS による検出において、DBD-PyNCS が MS の感度を低下させる要因となることを示していることからも、グラジエント条件をさらに最適化し、MS 検出部における高感度な検出条件の最適化を行う。またサンプルの濃縮条件の検討を行い、D 体アミノ酸の検出方法についても今後検討する予定である。

共同研究者・謝辞

LC-MS の導入と実技指導ならびに検出条件の最適化において協力いただいた、株式会社日立ハイテクサイエンスの森川悟様、橋本誠様に心より感謝申し上げます。

LC-MS 装置の導入に際しまして協力いただきました、センシュー科学小林真吾様に心より感謝申し上げます。

文　献

1) Sakamoto T, Kuwabara R, Takahashi S, Onozato M, Ichiba H, Iizuka H, Fukushima T. Determination of D-serine in human serum by LC-MS/MS using a triazole-bonded column after pre-column derivatization with (S)-4-(3-isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7- (N, N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole. Anal Bioanal Chem. 2016 Jan;408(2):517-26. doi: 10.1007/s00216-015-9119-y.

2) Sakamoto T, Onuma R, Furukawa S, Hayasaka A, Onozato M, Nakazawa H, Iizuka H, Ichiba H, Fukushima T. Liquid chromatography-mass spectrometry with triazole-bonded stationary phase for N-methyl-D-aspartate receptor-related amino acids: development and application in microdialysis studies. Anal Bioanal Chem. 2017 Dec;409(30):7201-7210. doi: 10.1007/s00216-017-0682-2.

3) Sandoval RM, Reilly JP, Running W, Campos SB, Santos JR, Phillips CL, Molitoris BA. A non-nephrotoxic gentamicin congener that retains antimicrobial efficacy. J Am Soc Nephrol. 2006 Oct;17(10):2697-705. doi: 10.1681/ASN.2005101124.

4) Hosohata K1, Ando H, Fujimura A. Urinary vanin-1 as a novel biomarker for early detection of drug-induced acute kidney injury. J Pharmacol Exp Ther. 2012 Jun;341(3):656-62. doi: 10.1124/jpet.112.192807.

5) Kimura T, Hamase K, Miyoshi Y, Yamamoto R, Yasuda K, Mita M, Rakugi H, Hayashi T, Isaka Y. Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease. Sci Rep. 2016 May;6:26137. doi: 10.1038/srep26137.

6) Ganote CE, Peterson DR, Carone FA. The nature of D-serine--induced nephrotoxicity. Am J Pathol. 1974 Nov;77(2):269-82. PMID: 4447130.