

〈一般研究課題〉 呼気による治療薬物モニタリング法の確立

助成研究者 中部大学 山本 敦



## 呼気による治療薬物モニタリング法の確立

山本 敦  
(中部大学)

### Studies on therapeutic drug monitoring method using exhaled breath

Atsushi Yamamoto  
(Chubu University)

#### Abstract :

We have established a method to determine the amount of drug in human exhaled breath as a concentration. The exhaled breath aerosol, EBA, is involved in drug transport during exhalation. To determine the drug concentration in the exhaled breath, it is necessary to determine this EBA volume. We constructed a human breath collection device that can collect EBAs while measuring their size with a particle size distribution analyzer. Create a double tube structure at the outlet of the dust mask, and dust-free air passed through a HEPA filter was sent to the outer tube. Exhale to the inner tube, EBAs were collected while measuring their size. When the amount of urea in the exhaled breath was measured using this device, good linearity ( $r^2 = 0.943$ ) was obtained with the EBA volume determined by the particle size distribution analyzer. Although the calculated EBA volume was unexpectedly small, and not all EBA was measured by this device, we thought that a good correlation is evidence that EBAs are counted at a constant rate. Therefore, we compared the drug concentrations in the exhaled breath with that in the blood after taking the antihistamine, fexofenadine. The drug concentration in the EBA was same order of magnitude as that in the blood, although their concentration profiles were different. We believe that our self-made device can measure and collect EBA volume at the same time.

## 1. はじめに

図1は、WHOから報告されている世界における死因をまとめたものである。グレーのバーで表される肺疾患による死亡者総数は、心臓病に次ぐ。特に慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、先進国では大きな死因の一つとなっている。肺は外界と繋がっており、細菌性肺炎などのさまざまな感染症の部位であり、呼吸器は多くの重要な死に至る病気の根本である。

オバマ元米国大統領は、科学技術に関連する政策として、2015年に「精密医療」を提案した。これは、ヒトゲノム情報を用いた疾患感受性や薬剤感受性などの遺伝子多型情報に基づく医療を提供するもので、従来の「個別化医療」を超えた概念である。この概念を実現するためには、薬物代謝の個々の状態を確認するための正確な治療薬物モニタリング (TDM) が必要となる。肺がんを含む多くの肺疾患は、適切な薬物投与設計が可能であれば、死亡率を低下させる可能性がある。問題は、これらの病気の発生率が加齢とともに増加し、多くの患者が高齢者であるということ。加齢に伴う高齢者の生理機能の変化には個人差が大きい。高齢者におけるTDMの必要性には議論の余地はないが、血液TDMのトラフ値によって高齢者の薬物動態を把握できるという保証もない。

現在の血中TDMでは、血中の薬物濃度と治療効果および副作用との相関関係に基づいて薬物投与量が決定される。TDMで本当に必要な情報は、病変部位の薬物濃度である。例えば、肺がんの場合、肺がん組織内またはその近くの薬剤濃度が重要であり、血中の薬剤濃度がいくら高くても、患部の薬剤濃度が低いと効果的な治療は期待できない。

呼気中のエアロゾル (EBA) は、細気管支被覆液そのものが微粒子となって排泄されるといわれている [1]。EBAを使用したTDMは、肺組織の薬物動態を理解する上で、血液よりも優れた結果をもたらすであろう。しかしながらEBAによるTDMにはいくつかの問題がある。特に、薬剤担体で

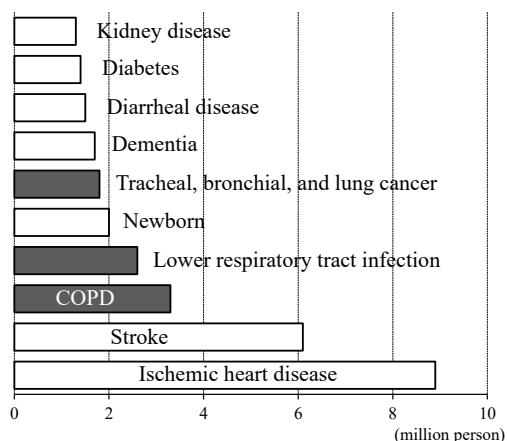


図1. 世界の死因トップ10 (2019)

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

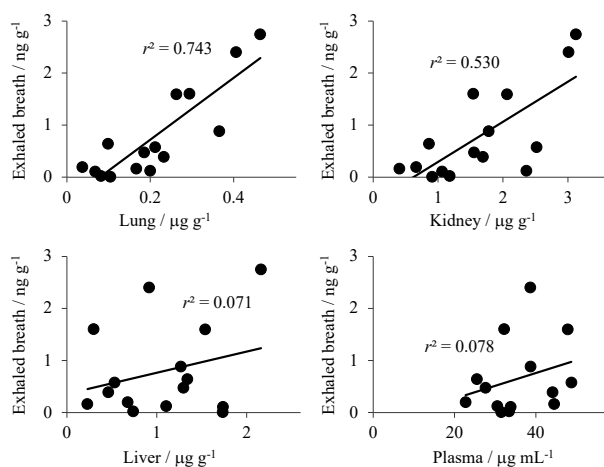


図2. 呼気中のテオフィリン量と血中及び臓器中薬物濃度との相関。呼気中の薬物量は、薬物静注後10-20分後の採取量で、水蒸気排泄量との比で表す。臓器中の薬物濃度は、投与20分後のものである。

あるエアロゾル量の測定が困難である。薬物濃度に変換するための内因性標準物質の探索は続けられているが[2]、光学式粒度分布計を使用したエアロゾル粒子の分布測定する方法は、人間の呼気でより現実的になりつつある [3]。もう一つの課題は、呼気中の薬物濃度が実際に肺組織濃度を反映していることを証明することである。この課題は、ヒト呼気分析では解決できない。著者らは、動物を使った基礎研究が必要との信念に基づき、一回換気量がヒトの100分の1以下であるラット呼吸実験を繰り返してきた[4]。ラット実験では、呼気と血中の薬物濃度に加えて、臓器内の薬

物濃度を測定することができるからである。その結果、ラット呼気から排泄される薬物量と最も相関が高いのは、肺組織中における薬物濃度であることが判明した(図2参照)。そこで本研究では、ヒト呼気中の薬物濃度を正確に求める方法を確立することを目的とする。そのために、ヒト実験による粒度分布計からのエアロゾル体積の評価が可能となるような呼気採取装置の構築を目指した。

## 2. 試料および実験方法

EBA回収用の吸着剤は、親水性モノマー、グリシジルメタクリレートと疎水性架橋剤、ジビニルベンゼンを懸濁重合させた樹脂 (BG15) を合成し、粒径180-250  $\mu\text{m}$ に分級して使用した。

無塵空気を送り込む二重管構造を持ったマスクを3Dプリンターで印刷した。吸気には無塵空気を被験者の口元に送りこみ(約10 L/min)、呼気をポンプにより吸引した(約3 L/min)。その過程で粒度分布計でのエアロゾル体積測定と標的物質の吸着剤への捕集を行った。被験者からの呼気捕集は4~7分間で行った。

捕集した尿素は5 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.2) で溶出し、ウレアーゼを加え40°Cで10分間インキュベートした。SAXカラムを通して除タンパクした後、アンモニウムイオンとしてMetrohm社製 883 Basic IC plusで測定した。

被験者に60 mgのフェキソフェナジン (FF) を経口投与し、経過時間ごとに10分間の呼気と血液を採取した。捕集したFFはメタノールで溶出しLC-MS/MS (Sciex社製 API-4000) で測定した。検出はプレカーサイオン $m/z$  502 ( $\text{MH}^+$ )、プロダクトイオン $m/z$  466, 171で行った。血中FFは血漿をメタノールで希釈し、フィルターでろ過後、LC-MS (Agilent Technologies社製6140) で測定した。検出は $m/z$  502 ( $\text{MH}^+$ )で行った。

ヒトを使った呼気実験は、中部大学倫理委員会承認の上(承認番号20190092)で行った。

## 3. 実験結果

まず、図2の結果の解釈から始めなければならない。覚醒下のラットに気管支拡張薬、テオフィリンを30 mg/kg静注し、10分後に10分間採取した呼気と、その直後に採取した血液、臓器の薬物量を比較したものである。血中の薬物濃度は、投与後10分で安定し、その後緩やかに減衰していく。この間、臓器中の薬物濃度は急激に増加していく。呼気から排泄される薬物量が肺組織中の濃度と最も相関が認められることは、薬物の血中から肺組織、そして呼気への移行が順を追って行われていることを明確に示している。呼気薬物量と他の臓器との相関が低いことは、血液からの臓器への移行速度に個体差があるのであろう。上述のEBAは肺胞上皮被覆液そのものであるという仮説を明らかにするには、ラット呼気中のエアロゾル体積測定法が確立され、臓器中への薬物移行が平衡に達した時点での呼気中薬物濃度の測定が不可欠である。

### 3.1 ヒト呼気採取装置の構築

平均粒径が約0.4  $\mu\text{m}$ とされるヒトEBA捕集は、吸引ポンプアシストのカートリッジで行うことで、慣性衝突法(インパクター)では不可能な0.3  $\mu\text{m}$ 以下のEBAにも対応可能である。カートリッジに吸引されたEBAと粒度分布計でカウントされるEBAが等しくなるためには、両者の吸引量を等しくすればよいと考えた。粒度分布計で呼気中のEBAのみを測定するためには、ヒトの安静呼吸時のフローボリューム曲線から30 L/min以上の無塵空気を供給しなければならない。これを

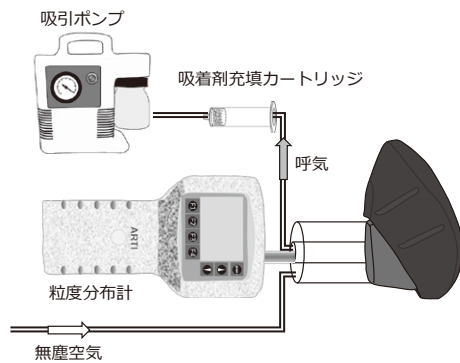


図3. ヒト用呼気採取装置

ように思える。ところが、この相関直線の傾きは  $2.2 \times 10^4 \text{ mol/L}$  と異常な高値を示す。今回尿素量は、酵素分解で生成されるアンモニウムイオン量で定量した。従来の呼気凝縮液中からの尿素量が  $\sim 100 \text{ nmol/7 min}$  との報告 [5] に比べて大きな値が得られているが、吸着剤を使った慣性衝突法のEBA捕集効率の高さを示すもので、呼気中からの排泄量としては妥当と考える。問題はEBA容積のほうにある。図2左上のラット呼気テオフィリン濃度レベルが肺組織濃度と同じくらいであると仮定すれば、ラット呼気から10分間で吐き出されるEBA量は数十 nL である。ヒトの呼気量はラットより二桁大きく、排泄されるEBA径も大きいことより、この5分程で排泄されるEBA量を数十  $\mu\text{L}$  と見積もる。図4の傾きは  $< 10^{-2} \text{ mol/L}$  となり、これは血中尿素窒素の値とほぼ一致する。今回、正確にEBA量が把握できていないのは、用いた粒度分布計の個体によるものか、EBAの量が装置の検出容量を超えているからなのか不明であるが、尿素量との間に良好な直線性が成り立つことより、本呼気採取装置においては一定の補正係数を用いることでEBA容積が把握できることが判明した。

### 3.2 ヒト呼気採取装置による呼気薬物濃度の測定

今回構築したヒト呼気採取装置では、補正係数を使用することで排泄されたEBA容積とそれを使った薬物濃度が求まる可能性が明らかとなった。そこでこの装置を使い、服用した薬物の肺組織における濃度が算出できるかを検討した。薬物としては抗ヒスタミン薬であるフェキソフェナジン (FF) を選択した。理由としては、一回服用量が60-120 mgと多いこと、体内でほぼ代謝されることなくそのまま排泄されること、分布容積 ( $V_d$ ) が1より大きいこと

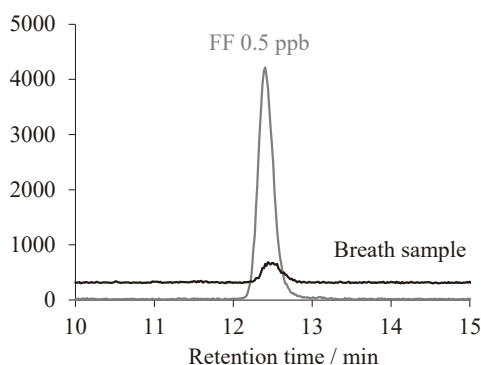


図5. 呼気試料中 FF の LC-MS/MS クロマトグラム

カートリッジ、粒度分布計合わせて数L/minで吸引してはEBA捕集効率が低下する。そこで、捕集装置は二重管構造とし、空気供給側と吸引側を分けた。同時に空気供給側にヒトの一回換気量に相当する500 mLの空気だめを作ることによって、無塵空気の供給量を減らすことができた。

図4に、この装置で回収したヒト呼気中の尿素量とEBA体積計算値を表す。両者には極めて良好な直線関係が得られ、粒度分布計は一見EBA容積を把握できている

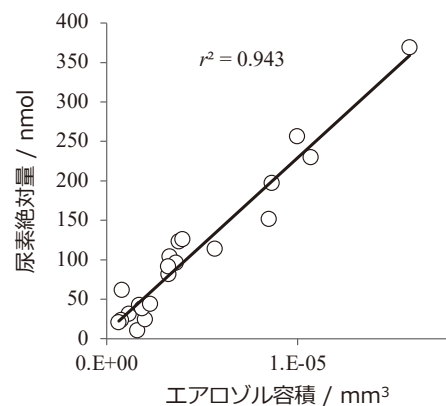


図4. 光学式粒度分布計で算出した呼気エアロゾル容積と捕集された尿素量との関係

ようである。図4の傾きは  $< 10^{-2} \text{ mol/L}$  となり、これは血中尿素窒素の値とほぼ一致する。今回、正確にEBA量が把握できていないのは、用いた粒度分布計の個体によるものか、EBAの量が装置の検出容量を超えているからなのか不明であるが、尿素量との間に良好な直線性が成り立つことより、本呼気採取装置においては一定の補正係数を用いることでEBA容積が把握できることが判明した。

花びら症の既往を持ち、FFを服用している被験者に、前日のFF服用を控えてもらった。60 mg FFの服用前と服用後2時間おきに呼気と指先穿刺による血液を採取した。図5にヒト呼気中に排泄されたFFのクロマトグラムを示す。ラットに投与したテオフィリン量の1/30程度であるが、回収されたEBA量が3桁ほど高



いので、FFの定量は十分に行えている。プレカーサイオンがm/z 502と大きいのでMSによる定性精度は高いと思われるが、吸着剤からのEBA溶出液を精製処理なしで測定しているため定量精度には不安が残る。回収時に計測したエアロゾル粒度分布と尿素量から得られた補正係数を使って

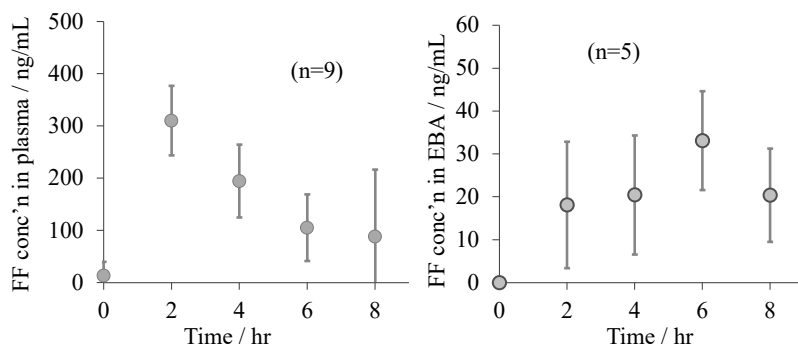


図6. フェキソフェナジン服用後の呼気及び血漿中の薬物濃度推移

EBA容積を算出し、さらにFF呼気濃度として求めた。測定結果を図6に示す。呼気中FF濃度が血中値よりも一桁ほど小さくなった。FFの $V_d$ はヒトで5.4-5.8 L/kgとされ、組織への移行が容易とされる薬物であるが、血液-肺関門が存在するのかもしれない。図左の血漿中で

の薬物濃度では、服用後2時間付近で極大を示したが、最高血中濃度到達時間は60 mg服用で2時間前後とされ [6]、インタビューフォーム通りの結果であった。一方、図右の呼気中の薬物濃度は、増加傾向にあった。これもラットに経口投与した $^{14}\text{C}$ -フェキソフェナジンの肺組織中の濃度が、8時間後でも殆ど減衰していないという報告 [6] と矛盾しない。

#### 4. まとめ

今回のコロナ禍で明確になりつつある事例に、コロナウィルスの空気感染がある。マスクできちんと予防すればインフルエンザの感染も防げることがある。肺胞上皮被覆液中に存在するこれらウィルスは、呼気中のエアロゾルとともに体外へ排泄されるのである。本研究では、呼気エアロゾル容積とそこに溶解している尿素量との相関で、粒度分布計による呼気エアロゾル容積算出の妥当性を検証したが、ヒト血液中の尿素窒素 (BUN) 基準値には幅が存在するため、この値も含めた検証が必要になってくるであろう。結果として、現在の呼気分析でエアロゾル容積の指標となっている尿素的の信ぴょう性も評価できることになる。尿素は親水性の低分子ゆえに肺胞間質膜を自由に透過できる、すなわち尿素的の肺胞上皮被覆液/血漿濃度比 (A/P ratio) は1であるとの仮定の上での黄金律である。本研究を継続することでA/P比の真偽も明らかになるものと思われる。

本研究でのラット実験、ヒト実験の結果より言及できることは、1) 呼気エアロゾルは肺胞上皮被覆液である可能性が高い、2) 呼気エアロゾルの粒度分布から排泄されたエアロゾル体積の推測ができる、の二点である。これらの不分明が明らかにできれば、呼気は呼吸器系疾病のTDMのための最良の体液であると断言できる。1) では、ラット呼気中の微細なエアロゾル量計測が不可欠となる。生理食塩水吸入による呼気エアロゾル粒径の増大化が現実的であると考える。2) では、粒度分布計での計測値が捕集されたエアロゾルの全量となるような装置改良が必要となる。これはラット呼気エアロゾル測定にも関連する事案であり、これら問題の解決によって真のTDMが可能になるよう今後とも研究を継続していく。

## 参考文献

- [1] K. Haslbeck, K. Schwarz, J.M. Hohlfeld, J. Seume, W. Koch, *J. Aero. Sci.*, 2010, **41**, 429-438.
- [2] D. Valeyre, P. Soler, G. Basset, P. Loiseau, J. Pre, P. Turbie, J.P. Battesti, R. Georges, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1991, **143**, 1096-1101.
- [3] A.D. Tinglev, S. Ullah, G. Ljungkvist, E. Viklund, A-C. Olin, O. Beck, *J. Breath Res.*, 2016, **10**(2), 026001/1-026001/9.
- [4] A. Yamamoto, S. Hioki, C. Tanada, T. Miwa, Y. Inoue, R. Yamamoto, M. Matsushima, T. Kawabe, *Anal. Methods*, 2015, **7**, 423-427.
- [5] C.R. Esther Jr., G. Boysen, B.M. Olsen, L.B. Collins, A.J. Ghio, J.W. Swenberg, R.C. Boucher, Mass spectrometric analysis of biomarkers and dilution markers in exhaled breath condensate reveals elevated purines in asthma and cystic fibrosis, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2009, **296**, L987-L993.
- [6] [https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/780069\\_4490023F1024\\_1\\_022\\_1F.pdf](https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/780069_4490023F1024_1_022_1F.pdf)