



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

マウス骨格筋中のダプトマイシンの定量法開発に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-06-17 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 阪井, 祐介 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/77970

マウス骨格筋中のダプトマイシンの
定量法開発に関する研究

Development of Quantification Method for Daptomycin in
Murine Skeletal Muscles

連合創薬医療情報研究科 創薬科学専攻

阪井 祐介

目 次

第一章 緒言	1
第二章 汎用的抽出法を用いたマウス骨格筋からのダプトマイシンの回収	6
第三章 トリプシン消化を用いたマウス骨格筋試料の前処理法	
第一節 ダプトマイシン回収に適する酵素の選定	9
第二節 トリプシンによる骨格筋試料前処理条件の最適化	11
第三節 マウス骨格筋を用いたダプトマイシンの添加回収	13
第四章 皮下投与マウス骨格筋中のダプトマイシンの定量	16
第五章 結論	19
実験の部	20
引用文献	23
謝辞	28

第一章

緒 言

ダプトマイシン (DAP) は *Streptomyces roseosporus* より産生されるリポペプチド抗生物質で、現在、唯一臨床応用されているものである。DAP はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を含むグラム陽性球菌に対し、速やかかつ濃度依存的な殺菌作用を示し、皮膚・軟部組織感染症¹⁻³⁾、MRSA 菌血症、感染性心内膜炎等⁴⁻⁶⁾の難治性の感染症の治療に使用されている。DAP は非タンパク性アミノ酸を含むトリデカペプチドであり、N 末端デカノイル脂肪酸とデカペプチドラクトン構造を有する。類似のリポペプチド抗生物質はみな同様に N 末端デカノイル脂肪酸とデカペプチドラクトンまたはラクタム構造を持ち、これらがカルシウムとの結合や抗菌作用において重要な役割を果たすとされている⁷⁾。臨床応用されていないものも含め、リポペプチド抗生物質にはペプチド環がアミド結合で閉じているツシマイシン等のグループとエステル結合で閉じている A21978C 類のグループの主に 2 種のグループがある。前者はペプチドグリカン前駆体の合成を抑制する事により、細胞壁合成を阻害するのに対し、DAP を含む後者はカルシウム濃度に依存した細菌の細胞膜への透過と脱分極を介したユニークな殺菌メカニズムを持つことが明らかとなっている^{5, 8)}。しかしながら、DAP の皮膚や筋肉など生体組織中への浸透と関連した活性のメカニズムは必ずしも完全に解明されているとはいえない。一方で、DAP を使用した治療における、特異的な副作用として、筋障害が広く知られており^{6, 9-11)}、また筋障害は骨格筋に特異的に起こることが報告されている¹⁰⁾。

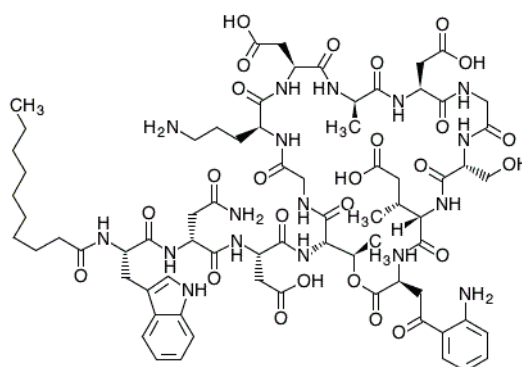


Fig.1. Structure of Daptomycin (DAP)

そして、その副作用は過量投与や¹⁰⁾投与間隔を短くした時に発生しやすいことが示されている¹¹⁾。

また、頻度は必ずしも高くないが、DAP治療の重篤な副作用として横紋筋融解症の発症に関するケースレポートも複数報告されている¹²⁻¹⁵⁾。

しかしながら、これらの副作用を引き起こす要因の特定は、今後の研究課題となっている。Kostrominovaらは、DAP投与ラットの骨格筋障害に関する免疫染色法を用いた病理組織学的実験から、DAP治療の早期に発生するラット骨格筋障害は筋線維鞘の秩序の喪失に起因することを報告している¹⁶⁾。また、副作用である骨格筋への影響を避けるためには、DAPは1日1回の処方が妥当であることも報告されている¹¹⁾。しかし、血漿中DAPの最高血中濃度(Cmax)や血中濃度-時間曲線下面積(AUC)の上昇は、血清クレアチニンホスホキナーゼ活性の上昇や筋障害の発症率とは単純には関連しないことが報告されている¹¹⁾。従って、筋組織への薬物の浸透や分布の特性、あるいはDAP治療における筋障害のメカニズム解明のためには動物を用いた詳細な基礎実験が必要であり、そのためには骨格筋中のDAPの正確な定量法の開発が不可欠となる。

DAPの定量方法に関する研究は、血漿中または血清中DAPを対象として、各種の検出法を利用した高速液体クロマトグラフィー法(HPLC法)や超高速液体

クロマトグラフィー法 (UHPLC 法) が開発されている。検出器は、紫外吸光 (UV)¹⁷⁻²⁰⁾、質量分析 (MS)²¹⁾、タンデム質量分析 (MS/MS)^{22, 23)}が用いられている。近年では、微生物を用いた比濁分析法も開発されており、DAP の抗菌活性も併せて評価することが可能であるが、欠点として生体試料などのように夾雑物を多く含む場合の定量には適用することが困難である²⁴⁾。生体試料に適応可能なクロマトグラフ法の報告の多くは、血漿や血清中の DAP を測定対象としており前処理としていずれの報告においても類似の手順が用いられている。Martens-Lobenhoffer らは、ヒト血漿にメタノールによる除タンパクを行い、上澄みをそのまま HPLC-UV 法にて分析するのみで極めて良好な回収率が得られることを報告している¹⁷⁾。一方、E. Gikasetn らはウサギ血清への除タンパク処理において、メタノールのみでは夾雑物が増え、アセトニトリルのみでは回収率が悪化したことからメタノールとアセトニトリル (1 : 2) の混合液にて除タンパクを行った後、上澄みの蒸発乾固を行い、その残渣を移動相で希釈して UHPLC-UV に注入することにより、低濃度、中濃度、高濃度でそれぞれ $102.5 \pm 4.3\%$, $100.6 \pm 5.1\%$, $96.5 \pm 3.6\%$ の高い回収率を得ている¹⁸⁾。Bazoti らも、ヒト血漿を用い、同様の前処理を行い UHPLC-MS/MS 分析により、低濃度、中濃度、高濃度でそれぞれ $96.1 \pm 8.3\%$, $98.6 \pm 7.5\%$, $93.5 \pm 5.3\%$ の回収率を得ている²²⁾。Naito らはヒト血漿のみならずヒト尿中からの定量法を報告しており、前処理として血漿には酢酸を添加して遠心分離を行い、尿にはメタノールを加え、上澄みをリン酸緩衝液で希釈することで、UHPLC-CV 法によりそれぞれ 95.6% , 105.4% と良好な回収率を得ている²⁰⁾。Baietto らは、HPLC-MS によるヒト血漿中の DAP、アミカシン、ゲンタマイシン、リファンピシンの多剤同時定量を試みており、アセトニトリルにより除タンパクした上澄みを水とトリフルオロ酢酸混液 (98 : 2) で希釈することにより、DAP について 90.5% の回収率を得ている²¹⁾。また、Baietto らはヒト血漿を対象としアセトニトリル、メタノールおよび水の混液 (10 : 1 : 1) を加え、遠心分離を行った上

澄みを蒸発乾固し、再溶解の後、再度、遠心分離して得た上澄みを UHPLC-UV 分析することで 94.48%の回収率が得られたことも報告している¹⁹⁾。Verdierらは、ヒト血漿を用い、アセトニトリルによる除タンパクの後に上澄みを水とアセトニトリルの混液 (=1 : 1) で希釈し、低濃度、中濃度、高濃度のいずれの領域でもそれぞれ $91.0 \pm 1.4\%$, $93.5 \pm 6.2\%$, $94.6 \pm 7.7\%$ の高い回収率を得ている²³⁾。これらはいずれも、血漿などの血液試料や尿中から DAP を高い割合で抽出しており、検体の種類を問わず良好な回収率が得られている。個体からの抽出の報告としては、吸水性のデバイスに DAP 含有ヒト血漿を添加し乾燥後、一定期間保管したものから DAP を抽出し、分析することが試みられている。これは臨床の現場においては DAP の TDM を行える施設が不足していることや、試料を長期間安定して保管することが困難であることから、DAP 含有血漿を扱い易い形態として保存するためである。デバイスより酢酸エチル、酢酸、アセトン、水 (50 : 20 : 20 : 10) からなる液で DAP の抽出を行い、上澄みを蒸発乾固し、再溶解の後、再度遠心分離して得た上澄みを UHPLC-UV 分析した結果、デバイス中の DAP の保存性は良好であったが、回収率は 14.18%と低い値であった¹⁹⁾。このように血液、尿中などの DAP の定量は活発に研究がされてきた。一方、DAP の組織への浸透に関するデータは非常に少なく、また組織中の DAP 濃度の測定法開発に関する報告例も極めて少ない。学術論文として報告されているものでは、ラット皮膚を用いた薬物動態試験²⁵⁾および人骨中の DAP を測定した臨床試験に限られている²⁶⁾。前者における抽出法は組織を pH 6.0 のリン酸緩衝液に 18 時間浸漬した後、遠心分離する方法であり、歯根肉芽腫組織中のアンピシリン定量方法に倣ったものである²⁷⁾。また、後者においては、一定量の粉砕した膝関節骨に pH 6 のリン酸緩衝液を加え、攪拌と超音波処理をしたものを 2 時間冷蔵した後、遠心分離を行い、上澄みの回収を行う一連の操作を 3 回繰り返している²⁶⁾。これらの報告ではこのようにして得た上澄みを HPLC-UV 法で分析している^{25, 26)}。しかしながら、用いられた抽

出法によって、ホモジナイズされた皮膚組織の懸濁液や粉砕された人骨からの DAP の抽出率に関する詳細は不明である。従って、報告にある抽出方法によって測定された DAP 濃度の真度は定かではない。

Kato らは感染症モデルマウスを用い、DAP の初期負荷投与を行った予備実験において筋組織中の DAP の定量を試みた²⁸⁾。しかしながら、生体組織中の薬物分析の試料調製方法として広く知られているホモジナイズと超音波処理による抽出方法を、筋肉組織に対して適用したが、測定したクロマトグラム上に DAP のピークを検出することはできず、筋肉中から DAP を抽出することはできなかった。従って、骨格筋から DAP を効果的に抽出する前処理方法を開発することは、筋組織中に移行した DAP の定量に必要不可欠であると考えられる。著者の知る限り、骨格筋中の DAP 濃度測定法を確立しようとした試みは報告されていない。

本研究では、DAP の筋組織中への薬物移行や DAP 治療の骨格筋障害（副作用）のメカニズム解明に資するため、マウス骨格筋中の正確な定量のための前処理法を開発した。また、開発した方法を利用して、DAP を単回皮下投与したマウスから採取した大腿筋を試料として、実際の大腿筋中の測定を行った。

第二章

汎用的抽出法を用いたマウス骨格筋からのダプトマイシンの回収

ホモジネーションと超音波処理による典型的な液相-固相抽出法は、薬物などの有機化合物を生体固体試料中から抽出する手段として現在も汎用されている^{25, 26)}。またクロロホルムとメタノールおよび水を用いた抽出法は、脂溶性成分を含む混合物の分離に用いられており Bligh-Dyer 法と呼ばれている。本法は DAP やバンコマイシンなどの水溶性薬物を水性の上澄みへと移行させることが知られている²⁹⁾。著者は本法を、汎用的抽出法として本研究の基礎抽出法として用いた。汎用的抽出法において、水溶性である DAP とバンコマイシン塩酸塩は大腿筋ホモジネートから抽出液の水相に抽出されるものと期待した。著者は筋組織中からの DAP 抽出のための予備試験としてブランク大腿筋 (0.2 g) に対し 1.0×10^{-4} M のストック溶液 20 μ L を添加したマウス骨格筋を作成し DAP およびバンコマイシンの添加回収試験を行った。Fig.2 はその抽出手順を示したものである。HPLC における検量線はそれぞれの薬物の各濃度の標準液と内標準とピーク高さの比より作成した。検出限界は S/N 比 3 以上の最低濃度とし、DAP およびバンコマイシンにおいてそれぞれ 0.3 μ M および 0.4 μ M であった。両薬剤において事前に予測された試料中濃度に対応した定量上限である 0.75 μ M での精度は 20%以内であった。検量線は 0.75 から 10 μ M (DAP: $n = 6, r = 0.992$, バンコマイシン: $n = 6, r = 0.999$) の範囲で直線性を示した。

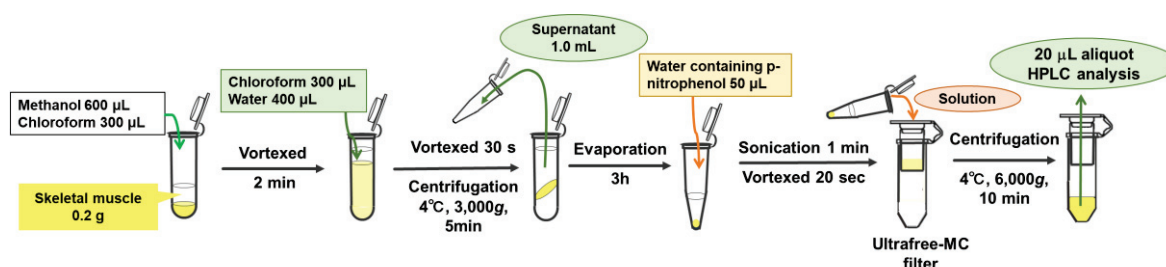


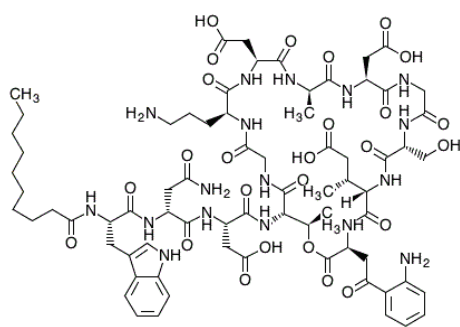
Fig.2. Sample Preparation Procedures for the Conventional Extraction

精度は相対標準偏差（RSD）より算出した。0.75 μM 、2.5 μM 、および 7.5 μM の DAP 標準液を用いて測定した RSD 値はそれぞれ 12.86%、6.76%、2.18%であった。また 0.75 μM 、2.5 μM 、および 7.5 μM のバンコマイシン標準液を用いて測定した吸光度の RSD 値はそれぞれ 15.01%、5.28%および 1.85%であった。

Fig.3 は DAP およびバンコマイシンそれぞれ 3 検体について添加後経過時間と回収率をプロットしたものである。

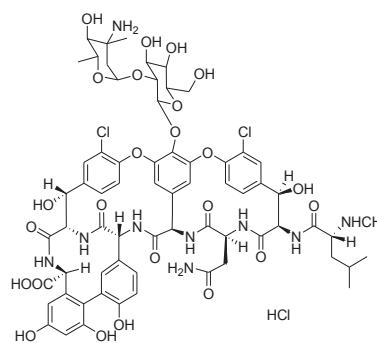
これらの結果は、回収率が薬剤添加後の経過時間に依存することを示している。Fig.3 に示すように、バンコマイシンの平均回収率はいずれの経過時間においても 96%–104%であった。一方、DAP の回収率は時間の経過と共に指数関数的に減少し、約 25%に収束した。この結果は骨格筋 1 g あたり 12 μg の DAP が何らかの特別な結合により筋肉組織中に取り込まれており、それらは分配平衡による溶液抽出では回収困難であることを示唆している。

DAP の血漿タンパク結合率は約 92%と高率であることは広く知られているが⁹⁾、血漿中からはメタノールやアセトニトリル等による除タンパクと遠心分離による通常の前処理でタンパク結合により干渉されることなく、容易に血漿中から回収可能である¹⁷⁻²³⁾。それ故、現段階では DAP が筋組織中へと取り込まれる物理化学的機序については明らかではないが、この事実は臨床分析化学の観点からは非常に興味深い。



(a) daptomycin (DAP)

MW: 1620.6



(b) vancomycin

MW: 1449.2

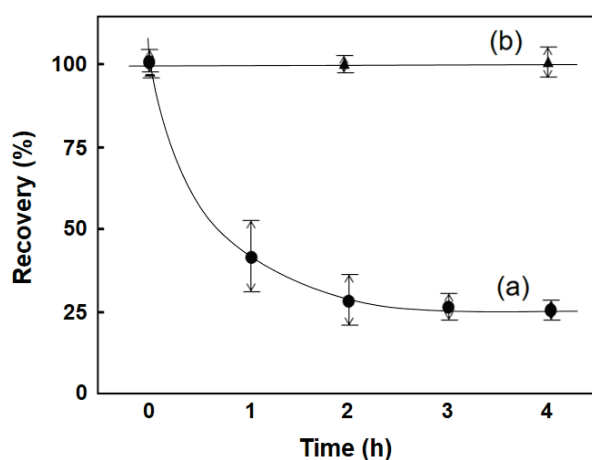


Fig. 3. Dependence of Recovery Ratios of DAP (a) and Vancomycin (b) on the Time to Start Conventional Extract after Spiking Murine Skeletal Muscles

The muscle samples were prepared by spiking analyte-free femoral muscle (0.2 g) with 20 μL of the 100 μM standard solution of the drug, and were treated according to procedure P1 shown in Fig. 1. In the case of vancomycin, 0.1 M HCl (100 μL) and 300 μL water were added instead of 400 μL water in the P1 procedure to dissociate vancomycin. Recovery calculated from the comparison with the peak height for standard solution prepared in the same concentration was evaluated by measuring three replicates of the samples. The error bars indicate the 95% confidence interval.

第三章

トリプシン消化を用いたマウス骨格筋試料の前処理法

第一節 ダプトマイシン回収に適する酵素の選定

前章の結果より、大腿筋中の DAP はアセトニトリルによる除タンパクと Bligh-Dyer 法のみでは十分な抽出が困難であることが明らかとなった。類似の例として、牛血漿中からトリクロロ酢酸を用い、ペプチドを抽出した場合、分子量 3000 以下の分子はほぼ抽出されなかった例³⁰⁾や、マウス血漿中からアセトニトリルで除タンパクを行い、アミロイド β -プロテインフラグメントの回収率が著しく不良であった例³¹⁾が報告されている。その機序としては有機溶媒添加によるペプチドの自己凝集又は爽雑タンパク質が凝集する際に測定対象のペプチドが共沈するためと考えられている³¹⁾。前章の結果からは分子量が同程度の DAP とバンコマイシンであっても DAP のみ経時的な著しい回収率の悪化を認めており、分子量のみがタンパク中からのペプチドの回収を困難とする決定因子ではないことが推察される。著者は骨格筋中に取り込まれた DAP を回収するために、リパーゼを用い脂溶性薬物を脂肪組織から効果的に抽出している事例³²⁾をヒントとして、酵素消化を用いた前処理法に着目した。

酵素消化法を HPLC 分析の前処理に用いた例では、有機溶媒^{33,34)}による除タンパクや超音波³⁴⁾による前処理に遜色のない結果が報告されている。

本研究において、使用する酵素は骨格筋に対し強い消化力を持ち、かつ DAP を分解しない特性が求められる。トリプシンは膵酵素であり、筋組織に対し強い消化作用を示し、濃度依存的な消化速度を示す^{35,36)}。分子作用機序としては、プロリン以外に隣接する、リジンやアルギニンのカルボキシル基側のペプチド鎖を特異的に開裂することが知られている³⁷⁾。この特性は DAP のデカペプチドラク

トン環を開裂しないものと考えられた。また DAP は酵素に晒された際、キモトリプシンや I 型プロテアーゼには加水分解されるにも関わらず、トリプシンによる加水分解の影響は受けないことが報告されている³⁸⁾。さらにトリプシンはカルシウムイオンやマグネシウムイオンに阻害されることは広く知られており、そのため、著者は骨格筋消化処理に最も適すると考え EDTA を含むトリプシン溶液を対象酵素として選定した。

第二節 トリプシンによる骨格筋試料前処理条件の最適化

トリプシン消化条件の最適化は筋組織への DAP の取り込みが収束していると考えられる DAP 添加後 3 時間経過した骨格筋を用いて行った。これらに対し、トリプシン標準液を添加後、インキュベーションを行い、引き続き汎用的抽出法を行った。Figure 4a は 37 °C で 10 分間酵素処理した時の トリプシン標準液の添加量と筋試料からの DAP の回収率をプロットしたものである。その結果、100 μ L 以上のトリプシン標準液の添加により指数関数的に DAP の回収率の増加を認めた。

この現象の詳細な機序は不明であるが、酵素反応において、反応速度は反応分子濃度に依存することが知られている³⁹⁾。

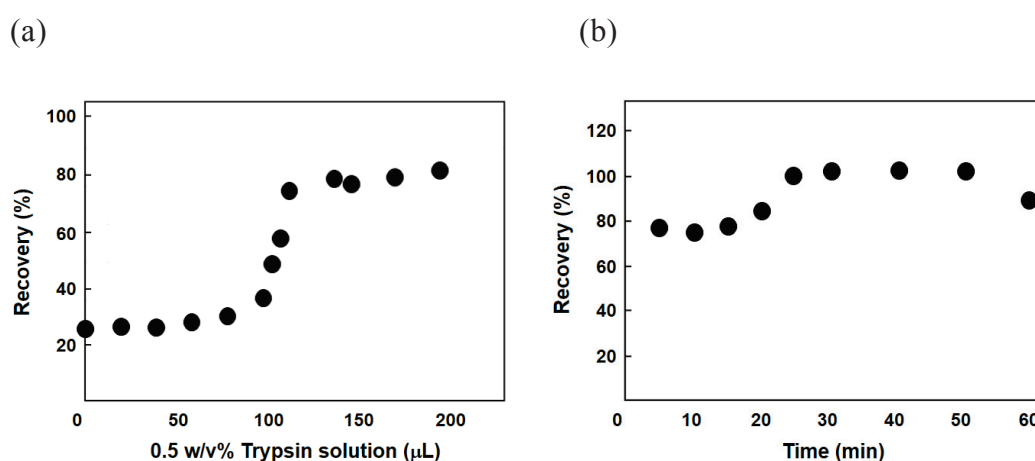


Fig. 4. Dependences of Recovery of DAP from the Muscle Spiked with DAP on the Amounts of Trypsin Standard Solution Used for Digestion (a) and on Incubation Time for Muscle Digestion (b)

The additional recovery samples were prepared by using analyte-free muscle (0.2 g) spiked with a 20 μ L aliquot of 50 μ M DAP standard solution, and treated with trypsin followed by the conventional extraction, as shown in Fig. 1. (a) Trypsin was used for muscle digestion involving incubation for 10 min at 37°C. (b) Incubation time was measured for muscle digestion with 150 μ L trypsin standard solution at 37°C.

トリプシン添加量の増加は筋組織の速やかな崩壊と液状化を促進し、基質となる DAP-筋組織結合部位濃度が速やかに上昇するため、酵素反応速度が上昇するものと考えられる。トリプシンと基質である DAP-筋組織結合部位は複合体を形成した後、その特異的なペプチド結合の開裂を伴うタンパク構造の変化を起し、DAP が瞬間的に放出されるものと推察される。

タンパク質の消化過程と DAP の遊離反応は競合阻害であるため、詳細な速度論的解析は容易ではないが、これら一連の反応の結果、一定の反応時間下において、トリプシン添加量に対し指数関数的な回収率の上昇を認めたものと考えられる。

一方で、Fig.4b は消化処理の時間と DAP 回収率の影響を示している。トリプシン標準液 150 μL 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間の処理で 0.2 g の大腿筋の完全な消化と約 100% の回収率が観察された。なお、留意すべき結果として、1 時間以上の消化処理では DAP の回収率の低下を認めている。これらの結果より、0.2 g のマウス骨格筋の消化には 150 μL トリプシン 標準液を用いた時には 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分の処理が最適条件であることが明らかとなり、以後の検討にはこの条件を用いた。Fig.5 はその処理手順を示したものである。

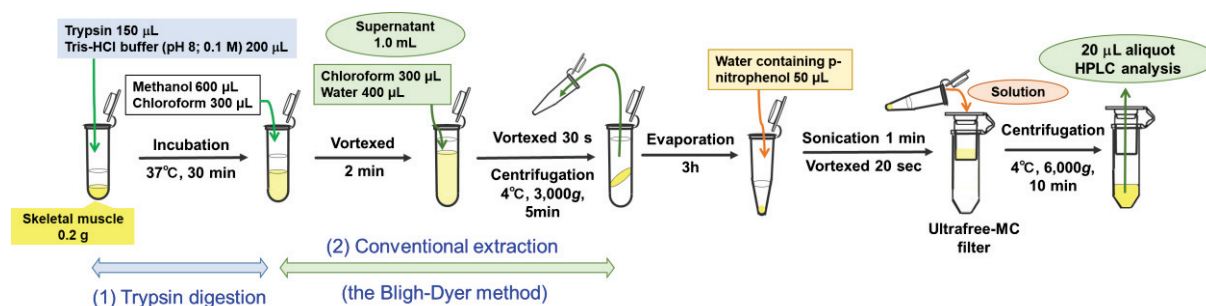


Fig. 5. Procedure for pretreatment involving the conventional extraction (Bligh-Dyer method) after trypsin digestion before HPLC analysis of DAP in mice skeletal muscle.

第三節 マウス骨格筋を用いたダプトマイシンの添加回収

著者は骨格筋に強固に取り込まれた DAP を抽出するために、トリプシン処理が非常に効果的であることを見出した。この知見より、著者は DAP 添加大腿筋からの回収実験を行った。試料は空白大腿筋 (0.2 g) に 50 μ M DAP 標準液 20 μ L を添加し、3 時間冷蔵し調製した。Figure 6 は前処理による回収率を比較検討するために、筋肉試料へ行った前処理手順を示したものである。Fig. 6A および Fig. 6C はそれぞれ、汎用的抽出法およびトリプシン処理の後に汎用的抽出法を適用して調製した試料 (4 サンプル) を HPLC 分析した結果である。

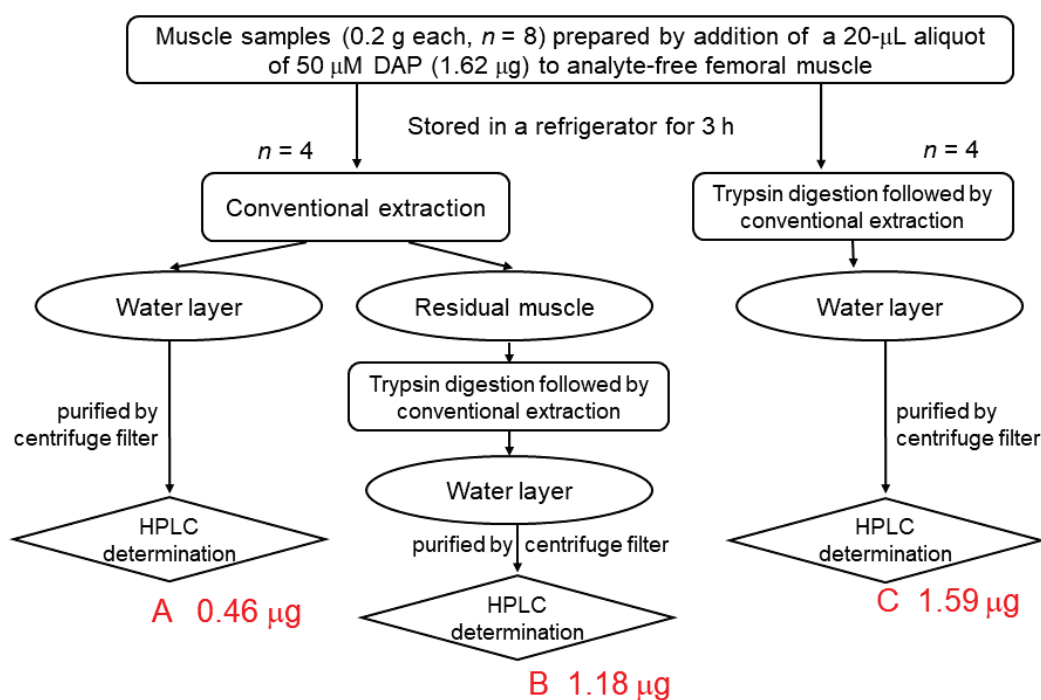


Fig. 6. Experimental Scheme for Recovery Assays from Skeletal Muscle Samples

The muscle samples were analyte-free femoral muscles spiked with 1.62 μ g DAP. The measured mean values ($n = 4$) are shown in red.

さらに、Fig. 6B は汎用的抽出法による処理後に、サンプルチューブ内に残った筋組織に対してトリプシン処理と汎用的抽出法を行って調製した試料溶液を HPLC 分析したものである。なお、Fig. 6 に平均の回収率も示している。興味深いことに、汎用的抽出法のみを行った A とその残渣にトリプシン処理および汎用的抽出法を繰り返した B の合計は、トリプシン処理および汎用的抽出法を行った C の回収率と同程度であった。この結果は 2/3 以上の DAP が筋肉タンパク中に強固に結合して存在しており、それらはトリプシンによる消化がなくては抽出が困難であることを示唆している。

Table 1 は 3 段階の異なる濃度で DAP を添加した大腿筋試料からの回収実験の結果である。

Table 1. Recovery Data and the RSD of DAP from Murine Skeletal Muscles Spiked with 0.064, 0.16, and 1.62 μg DAP.

Addition amounts (μg)	Recovery (%) ^{a)}					SD	RSD (%)
	1	2	3	4	Mean		
0.064 ^{b)}	75.2	42.3	87.3	52.8	64.4	20.52	31.87
0.16 ^{c)}	86.3	84.4	103.1	94.3	92.0	8.54	9.28
1.6 ^{d)}	97.5	99.5	101.1	100.3	99.6	1.54	1.55

a) Data obtained from HPLC analysis after sample pretreatment shown in Figs. 2 and 5.

b) Prepared by spiking a 20 μL aliquot of a 2.0 μM DAP standard solution. The concentration of this muscle sample is calculated as 0.32 $\mu\text{g}/\text{g}$ (muscle).

c) Prepared by spiking a 20 μL aliquot of a 5.0 μM DAP standard solution. The concentration of this muscle sample is calculated as 0.80 $\mu\text{g}/\text{g}$ (muscle).

d) Prepared by spiking a 20 μL aliquot of a 50 μM DAP standard solution. The concentration of this muscle sample is calculated as 8.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ (muscle). The mean value shown in Fig. 4C was obtained from these experiments.

0.064 μg 添加時（最も低濃度の場合）以外は生物化学分析の基準を満たしていた。この結果から DAP 添加筋組織へのトリプシン処理は 0.8–8 $\mu\text{g/g}$ （筋肉）の範囲において、高く安定した回収率が得られることが明らかとなった。一方で、Table 1 に示した通り、0.08 μg の添加時の RSD は基準を満たさなかった。本実験系における HPLC 注入時の最終濃度は 0.8 μM を下回っており、これは現在の HPLC-UV 法の定量下限（0.75 μM ）に近いものであった。

これらの結果から、実際の薬物投与時においても筋肉に直接添加する時と同様に DAP が筋組織に移行するという仮定の元で、トリプシン消化を含む前処理方法は、マウス骨格筋中の DAP を正確に定量可能とすることが明らかとなった。

第四章

皮下投与マウス骨格筋中のダプトマイシンの定量

著者は最適化された条件下において、DAP 皮下投与マウス骨格筋中の定量を試みた。DAP を 100 mg/kg 量となるように単回皮下投与し、投与 2 時間後にマウス大腿筋を採取し、Fig. 5 に示したトリプシン処理と汎用的抽出法による一連の抽出を行い、DAP の定量を行った。Figure 7 は筋肉試料の前処理のスキームと HPLC 分析から得られた結果である。

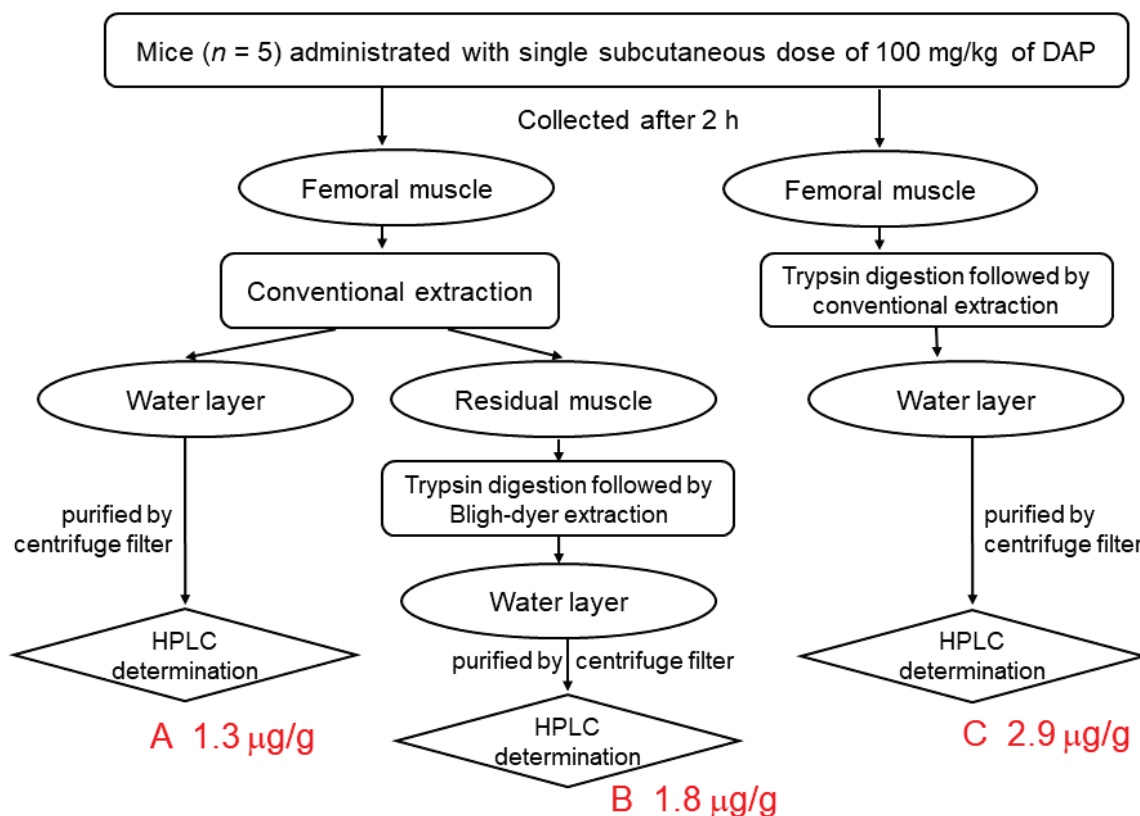


Fig. 7. Experimental Scheme for the HPLC Analyses of the Determination of DAP in Murine Skeletal Muscles Collected from Mice (n = 5) Administered a Single Subcutaneous Dose of 100 mg/kg DAP

添加実験と同様に、A は汎用的抽出法のみを行ったもの、B はその残渣にトリプシン処理および汎用的抽出法を繰り返したもの、C はトリプシン処理および汎用的抽出法を行ったものである。Table 2 には得られた測定値を示した。

in vivo の筋肉組織の分析結果においては、筋組織内の多様性や非検体物質の局在化等による誤差が起こり得るため、ある程度の結果のばらつきは予測された。得られた DAP 濃度は汎用的抽出法による筋肉前処理 (Fig. 7A) に比べ、トリプシン消化法 (Fig. 7C) の方が高かった。

また、添加実験と同様に、全ての検体において、それぞれ A と B の合計は C に近似するという関係性が見られた。

この結果は、実際に動物に DAP を投与した際にも、何らかの筋タンパクとの相互作用により、筋組織中に DAP が取り込まれており、それらの正確な濃度を定量する上でトリプシン処理が不可欠であることを示唆している。一方で、DAP の血漿および血清中濃度は数時間で明確に低下することが知られていることより^{23, 28)}、投与後 1 時間と 2 時間の筋肉中濃度は大きく変動するものと予測した。Table 2 には投与後 1 時間のマウスより採取した筋組織の結果も一部示している。

Table 2. DAP Concentrations in Murine Femoral Muscles Collected 2 h after the Single Subcutaneous Administration of DAP (100 mg/kg)

Procedure ^{a)}	Measured values of DAP ($\mu\text{g/g}$) ^{b)}					Mean	SD	RSD(%)
	1	2	3	4	5			
A	1.1	1.3	1.4	1.5	1.1	1.3	0.18	14.0
B	1.5	1.9	2.2	1.8	1.4	1.8	0.32	18.2
C	2.5	3.0	3.5	3.3	2.4	2.9	0.48	16.4
C (1 h) ^{c)}	3.0	2.8	3.8	-	-	3.2	0.53	16.5

a) Sample preparation procedures shown in Figs. 2 and 5.

b) Measured values are indicated by the amount (μg) of DAP contained in the 1g of muscle.

c) Data obtained from femoral muscle collected 1 h after administration of DAP.

しかしながら、1時間の検体と2時間の検体のDAP濃度は同程度であった。これらは未だパイロット試験の結果であり、本前処理方法を用い、薬剤投与後の血漿および筋肉中の薬物動態試験を行う必要がある。今回の実験系においては、通常の動物実験より若干高用量ではあったが、本前処理方法の骨格筋中のDAPの定量への適応の有用性が証明された。

第五章

結 論

マウス骨格筋中の DAP 生体試料分析のための前処理としての酵素処理の適性について評価を行った。著者らの結果はトリプシン処理が何らかのタンパク質との相互作用により骨格筋に強く取り込まれた DAP を分析するための前処理方法として非常に有効であることを明らかとした。トリプシン消化による本前処理法は今後 DAP の高感度分析法と組み合わせることにより、DAP が関連する筋障害を起こしやすい患者の因子の特定に使用できる可能性がある。

酵素消化法は簡便かつ安価な前処理法として、細胞培養等に用いられているが組織試料中からの薬物分子の前処理として用いる試みは少ない³²⁻³⁴⁾。Yu らは薬物の生体試料分析のための代替的組織前処理方法として酵素消化がホモジネーションと同等の抽出効率を示すことを報告している³³⁾。しかしながら、著者の知る限り、薬物と筋タンパクの相互作用から解離する方法として酵素消化法を評価した報告はない。本報告はトリプシン消化を用いた筋試料の前処理に関する初の報告である。現在、この筋処理法を用いた、血漿 DAP と骨格筋中の DAP 濃度に関する更なる薬物動態実験と、DAP と強固に相互作用を示すタンパク質の特定が進行している。これらに加え、DAP の骨格筋移行量は UV 検出器で検知するには極微量であるため、この前処理方法と併用する LC-MS/MS 等の高感度分析法の開発が必要である。

実験の部

1. 試料

DAP はフナコシ社(東京, 日本)より購入し、更なる精製などは行わず使用した。DAP は 100 μM の水溶液として 200 μL のサンプルチューブへと分注したものを冷凍保存し、各実験前に適切な濃度へと調製した。Streptomyces orientalis 由来バンコマイシン塩酸塩は Sigma-Aldrich より入手し、100 μM バンコマイシン塩酸塩ストックソリューションを調製し、冷凍保存した。HPLC 分析用内標準にはキシダ化学及びナカライテスク社 (東京, 日本) の分析用 4-ニトロフェノールと 4-ニトロ安息香酸をそれぞれ更なる精製などは行わず使用した。HPLC 移動相には関東化学社(東京, 日本)の HPLC-グレードのアセトニトリルを更なる精製などは行わず使用した。実験には Milli-Q Academic A10 apparatus (Merck Millipore)にて精製した超純水を使用した。血清はドラッグフリーマウス血清 (Cosmo Bio Co., Ltd, 東京, 日本) を購入し使用した。

2. マウス骨格筋および血清の採取

Charles River Laboratories Japan, Inc. (横浜, 日本) より購入した約 22 g の病原体フリースイスマウスを使用した。実験動物は全米研究評議会推奨の水準で飼育し、自由に給餌、飲水をさせた。本実験は愛知医科大学動物実験委員会の審査と承認を得て実施した。10 匹のマウスを薬物は使用せず二酸化炭素にて安楽死させた後、大腿筋を速やかに切除し、2 mL の滅菌冷凍生理食塩液(0.9 w/v%)と共にホモジナイズし、これらを回収実験用の分析対象物フリー大腿筋とした。ホモジナイズされた分析対象物フリー大腿筋は 0.2 g 片に分け、使用まで $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した。他の 8 匹のマウスには生理食塩液 200 μL に溶解した DAP 100 mg/kg を皮下投与し、

3 匹を 1 時間後、5 匹を 2 時間後にそれぞれ屠殺した。筋肉は分析対象物フリー大腿筋と同じ手順により採取し分析まで -80°C で冷凍保存した。

3. 抽出法

3.1 汎用的抽出法

湿重量約 0.2 g の筋組織を事前計量した 2 mL のサンプルチューブ (Watson) に入れ、正確な重量を測定した。メタノール (600 μL) とクロロホルム (300 μL) を加えた後に蓋を閉め、10 分間 vortex で攪拌した。続いて、内容物に 300 μL のクロロホルムと 400 μL の超純水を加えて、30 秒 vortex で攪拌し、その後 3,000 g で 5 分遠心分離を行い、薬物を水相へと抽出した。バンコマイシンの処理時にはバンコマイシンを解離させるために、400 μL の超純水の代替として 0.1 M HCl (100 μL) と 300 μL の超純水を添加した。上澄み (1.0 mL) をピペットで吸い上げ、エバポレーターにより蒸発乾固した。サンプルチューブ内の残渣を内標準を含む超純水 50 μL で溶解し、Ultrafree-MC フィルター (Merck Millipore, 0.22 μm pore size) を用い、6,000 g、 4°C で 10 分遠心分離した。得られた濾液 20 μL を HPLC カラムへ注入した。(Fig. 2)

3.2 トリプシン消化を併用した抽出法

フェノールレッドフリーの 0.5 w/v% トリプシンおよび 5.3 mM EDTA \cdot 4Na を含有するトリプシン-EDTA 溶液は富士フィルム和光純薬 (大阪, 日本) より購入し、トリプシン標準液として更なる処理を加えることなく使用した。正確に計量した筋ホモジネートを含むチューブ (2 mL) に、蓋をし、事前に 37°C で 30 分加温したものに、トリプシン標準液 (150 μL) と Tris-HCl 緩衝液 (pH 8; 0.1 M) (200 μL) を添加した。続いて、均一の懸濁液を得るために、vortex 攪拌を行った後に前述した汎用的抽出法を行った。(Fig. 5)

回収率は分析対象物フリー大腿筋に 0.064 μg , 0.16 μg , および 1.6 μg の 3 段階の量での DAP の添加回収試験を行い算出した。添加回収試験の試料は分析対象物フリー大腿筋 (0.2 g) に 0.064 μg , 0.16 μg , および 1.6 μg のレベルに対応し、DAP 標準液から調製した 2.0 μM , 5 μM および 50 μM の希釈液 20 μL をそれぞれ添加し作成した。同様に調製した試料 4 点を測定し算出した。

4. HPCL 分析

10AD VP HPLC システム (島津, 京都, 日本) に DGU-12A デガッサ (島津)、CLASS M10A (SPD-MXA) 吸光度検出器 (島津)、7125 型 シリンジ-ローディングサンプルインジェクター (Rheodyne, Cotati, CA, USA) を接続し使用した。分離には Inertsil® ODS-3 (150 \times 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) カラム (GL Sciences Inc., 東京, 日本) を使用し、移動相には DAP には、アセトニトリル 36%含有リン酸緩衝液緩衝液 (pH 2.1; 0.01 M) を、バンコマイシンにはアセトニトリル 10%含有リン酸緩衝液緩衝液 (pH 7.2; 0.01 M) をそれぞれ用いた。移動相の流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 40°C とし検出波長は DAP およびバンコマイシンでそれぞれ 221 nm および 280 nm とし Class M10A システム (島津) にてピーク分析を行った。

引用文献

- [1] C. Liu, Z. Mao, M. Yang, H. Kang, H. Liu, L. Pan, J. Hu, J. Luo, F. Zhou, Efficacy and safety of daptomycin for skin and soft tissue infections: a systematic review with trial sequential analysis, *Ther. Clin. Risk Manag.* 12 (2016) 1455-1466.
- [2] C. A. Schriever, C. Fernández, K. A. Rodvold, L. H. Danziger, Daptomycin: a novel cyclic lipopeptide antimicrobial, *Am J Health Syst Pharm* 62(11) (2005) 1145-1158.
- [3] L. I. Mortin, T. Li, A. D. Van Praagh, S. Zhang, X. X. Zhang, J. D. Alder, Rapid bactericidal activity of daptomycin against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* peritonitis in mice as measured with bioluminescent bacteria, *Antimicrob Agents Chemother* 51(5) (2007) 1787-1794.
- [4] R. Kullar, G. Sakoulas, S. Deresinski, S. J. van Hal, When sepsis persists: a review of MRSA bacteraemia salvage therapy, *J Antimicrob Chemother* 71(3) (2016) 576-586.
- [5] S. D. Taylor, M. Palmer, The action mechanism of daptomycin, *Bioorg Med Chem* 24(24) (2016) 6253-6268.
- [6] D. M. Livermore, Future directions with daptomycin, *J Antimicrob Chemother* 62 Suppl 3 (2008) iii41-iii49.
- [7] J. Micklefield, Daptomycin structure and mechanism of action revealed, *Chem Biol* 11(7) (2004) 887-888.
- [8] J. A. Silverman, N. G. Perlmutter, H. M. Shapiro, Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother* 47(8) (2003) 2538-2544.
- [9] R. Sauermann, M. Rothenburger, W. Graninger, C. Joukhadar, Daptomycin: a review 4 years after first approval, *Pharmacology* 81(2) (2008) 79-91.

- [10] F. P. Tally, M. Zeckel, M. M. Wasilewski, C. Carini, C. L. Berman, G. L. Drusano, F. B. Oleson, Daptomycin: a novel agent for Gram-positive infections, *Expert Opin Investig Drugs* 8(8) (1999) 1223-1238.
- [11] F. B. Oleson, C. L. Berman, J. B. Kirkpatrick, K. S. Regan, J. J. Lai, F. P. Tally, Once-daily dosing in dogs optimizes daptomycin safety, *Antimicrob Agents Chemother* 44(11) (2000) 2948-2953.
- [12] F. Sbrana, A. Di Paolo, E. M. Pasanisi, E. Tagliaferri, C. Arvia, M. Puntoni, A. Leonildi, F. Bigazzi, R. Danesi, D. Rovai, C. Tascini, F. Menichetti, Administration interval and daptomycin toxicity: a case report of rhabdomyolysis, *J Chemother* 22(6) (2010) 434-435.
- [13] A. Kazory, K. Dibadj, I. D. Weiner, Rhabdomyolysis and acute renal failure in a patient treated with daptomycin, *J Antimicrob Chemother* 57(3) (2006) 578-579.
- [14] S. Papadopoulos, A. M. Ball, S. E. Liewer, C. A. Martin, P. S. Winstead, B. S. Murphy, Rhabdomyolysis during therapy with daptomycin, *Clin Infect Dis* 42(12) (2006) e108-110.
- [15] S. T. King, E. D. Walker, C. G. Cannon, R. W. Finley, Daptomycin-induced rhabdomyolysis and acute liver injury, *Scand J Infect Dis* 46(7) (2014) 537-540.
- [16] T. Y. Kostrominova, C. A. Hassett, E. P. Rader, C. Davis, L. M. Larkin, S. Coleman, F. B. Oleson, J. A. Faulkner, Characterization of skeletal muscle effects associated with daptomycin in rats, *Muscle Nerve* 42(3) (2010) 385-393.
- [17] J. Martens-Lobenhoffer, J. T. Kielstein, C. Oye, S. M. Bode-Böger, Validated high performance liquid chromatography-UV detection method for the determination of daptomycin in human plasma, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 875(2) (2008) 546-550.

- [18] E. Gikas, F. N. Bazoti, P. Fanourgiakis, E. Perivolioti, A. Roussidis, A. Skoutelis, A. Tsarbopoulos, Simultaneous quantification of daptomycin and rifampicin in plasma by ultra performance liquid chromatography: Application to a pharmacokinetic study, *J Pharm Biomed Anal* 51(4) (2010) 901-906.
- [19] L. Baietto, A. D'Avolio, S. Pace, M. Simiele, C. Marra, A. Ariaudo, G. Di Perri, F. G. De Rosa, Development and validation of an UPLC-PDA method to quantify daptomycin in human plasma and in dried plasma spots, *J Pharm Biomed Anal* 88 (2014) 66-70.
- [20] T. Naito, T. Yamada, T. Yagi, J. Kawakami, Simple and validated UHPLC method coupled to UV detection for determination of daptomycin in human plasma and urine, *Biomed Chromatogr* 28(3) (2014) 317-319.
- [21] L. Baietto, A. D'Avolio, F. G. De Rosa, S. Garazzino, M. Michelazzo, G. Ventimiglia, M. Siccardi, M. Simiele, M. Sciandra, G. Di Perri, Development and validation of a simultaneous extraction procedure for HPLC-MS quantification of daptomycin, amikacin, gentamicin, and rifampicin in human plasma, *Anal Bioanal Chem* 396(2) (2010) 791-798.
- [22] F. N. Bazoti, E. Gikas, A. Skoutelis, A. Tsarbopoulos, Development and validation of an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of daptomycin in human plasma, *J Pharm Biomed Anal* 56(1) (2011) 78-85.
- [23] M. C. Verdier, D. Bentué-Ferrer, O. Tribut, N. Collet, M. Revest, E. Bellissant, Determination of daptomycin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clinical application, *Clin Chem Lab Med* 49(1) (2011) 69-75.
- [24] E. G. Tótolí, H. R. Salgado, Rapid Turbidimetric Assay to Determine the Potency of Daptomycin in Lyophilized Powder, *Pharmaceutics* 7(3) (2015) 106-121.

- [25] K. Matsumoto, M. Kitaoka, Y. Kuroda, K. Ikawa, N. Morikawa, J. Sasaki, O. Iketani, S. Iwata, T. Horino, S. Hori, J. Kizu, Pharmacokinetics and skin-tissue penetration of daptomycin in rats, *Clin Pharmacol* 7 (2015) 79-82.
- [26] D. Montange, F. Berthier, G. Leclerc, A. Serre, L. Jeunet, M. Berard, P. Muret, L. Vettoretti, J. Leroy, B. Hoen, C. Chirouze, Penetration of daptomycin into bone and synovial fluid in joint replacement, *Antimicrob Agents Chemother* 58(7) (2014) 3991-3996.
- [27] Y. Akimoto, H. Nishimura, M. Komiya, K. Kaneko, A. Fujii, T. Tamura, Ampicillin concentrations in human dental granuloma after a single oral administration of talampicillin, *Antimicrob Agents Chemother* 32(4) (1988) 566-567.
- [28] H. Kato, M. Hagihara, E. Murakami, H. Suematsu, N. Nishiyama, Y. Koizumi, Y. Yamagishi, B. Uno, H. Mikamo, Considerations about the Use of a Loading Dose of Daptomycin in a Neutropenic Murine Thigh Infection Model with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection, *Chemotherapy* 63(1) (2018) 13-19.
- [29] E. G. Bligh, W. J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can J Biochem Physiol* 37(8) (1959) 911-917.
- [30] N. Murao, M. Ishigai, H. Yasuno, Y. Shimonaka, Y. Aso, Simple and sensitive quantification of bioactive peptides in biological matrices using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry coupled with trichloroacetic acid clean-up, *Rapid Commun Mass Spectrom* 21(24) (2007) 4033-4038.
- [31] R. Goda, H. Masumoto, O. Okazaki, K. Sudo, Development of a pretreatment method for amyloid beta-protein analysis based on the effect of acetic acid on the dissolution of plasma polypeptides, *Biomed Chromatogr* 22(11) (2008) 1279-1287.

- [32] G. C. Storey, P. C. Adams, R. W. Campbell, D. W. Holt, High-performance liquid chromatographic measurement of amiodarone and desethylamiodarone in small tissue samples after enzymatic digestion, *J Clin Pathol* 36(7) (1983) 785-789.
- [33] C. Yu, L. D. Penn, J. Hollembaek, W. Li, L. H. Cohen, Enzymatic tissue digestion as an alternative sample preparation approach for quantitative analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal Chem* 76(6) (2004) 1761-1767.
- [34] A. Posyniak, J. Zmudzki, S. Semeniuk, Effects of the matrix and sample preparation on the determination of fluoroquinolone residues in animal tissues, *J Chromatogr A* 914(1-2) (2001) 89-94.
- [35] E. Mihalyi, A. G. Szent-Gyorgyi, Trypsin digestion of muscle proteins. I. Ultracentrifugal analysis of the process, *J Biol Chem* 201(1) (1953) 189-196.
- [36] E. Mihalyi, Trypsin digestion of muscle proteins. II. The kinetics of the digestion, *J Biol Chem* 201(1) (1953) 197-209.
- [37] L. Engelking, *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, third ed., Academic Press, Boston, 2014.
- [38] V. M. D'Costa, T. A. Mukhtar, T. Patel, K. Koteva, N. Waglechner, D. W. Hughes, G. D. Wright, G. De Pascale, Inactivation of the lipopeptide antibiotic daptomycin by hydrolytic mechanisms, *Antimicrob Agents Chemother* 56(2) (2012) 757-764.
- [39] D. R. Bish, M. L. Mavrovouniotis, Enzymatic reaction rate limits with constraints on equilibrium constants and experimental parameters, *Biosystems* 47(1-2) (1998) 37-60.

謝 辞

本研究を実施するにあたり、終始、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師宇野文二教授（岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科）に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を進めるにあたり種々の有益なる実験上の御助言、御指導を賜りました岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科・江坂幸宏准教授に深謝いたします。

マウス骨格筋を提供いただきました愛知医科大学および同大学病院，三嶋廣繁教授、萩原真生准教授、加藤秀雄博士に深謝いたします。

学位論文執筆にあたり種々ご指導いただきました岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科・田中稔幸教授，丹羽雅之教授に深謝いたします。

最後に、本研究遂行にあたり、種々ご協力下さいました岐阜薬科大学薬品分析化学研究室の諸氏に感謝致します。