

(様式4)

学位論文の内容の要旨

永野 大輔 印

(学位論文のタイトル)

Determination of Intracellular Darunavir by Liquid Chromatography Coupled with Fluorescence Detection

(蛍光検出器を用いた液体クロマトグラフィーによる細胞内ダルナビルの定量法)

(学位論文の要旨)

長期に亘る病勢コントロールが目的とされる抗 HIV 薬物療法においては、薬物投与に伴う副作用を適切にマネジメントしながら、抗 HIV 薬に対する耐性ウイルスの発現を防止するために十分な量の薬物を投与する必要がある、生体内の薬物濃度を適切な濃度範囲にコントロールできるかが治療のキーポイントになる。プロテアーゼ阻害薬の一種であるダルナビル(DRV)は、他の治療薬に抵抗性のHIVウイルスに対して有効な薬剤であり、その薬理活性発現部位である末梢血単核球細胞(PBMC)中濃度が、患者の臨床症状や薬剤耐性ウイルスの出現に影響を与えると報告されている。本研究では、蛍光検出器を用いた、高速液体クロマトグラフィー法(HPLC)による、ヒトPBMC中のDRV濃度を簡便かつ高感度に分析できる測定法を構築することを目的とした。

ヒト全血8 mLから、密度勾配遠心分離法を用い、PBMCを単離した。単離したPBMCを熱処理により、細胞膜を破壊した後、有機溶媒として酢酸エチルを用いた液相分配抽出を行った。熱処理と有機溶媒による抽出を行うことで、PBMCの細胞膜をほぼ完全に破壊できたと考えられる。HPLCは、固定相をYMC-Pack Pro C₁₈、移動相(リン酸緩衝溶液:アセトニトリル=57:43)を混液、流速を1.0 mLで溶離したDRVを、蛍光検出器(励起波長:235 nm、蛍光波長:337 nm)で検出した。

本研究で開発した測定法による、PBMC中DRVの定量下限濃度は5 ng/10⁶cellsであり、5-100 ng/10⁶cellsの濃度範囲において良好な直線性を確認できた。また、液相分配抽出率は86.3%であり、日内変動および日間変動は15%以下であった。本測定法を用いることにより、PBMCと同様の処理で血漿中濃度を測定することが可能である。血漿を20 μL用い、血漿中DRV濃度は0.5-10 μg/mLの範囲において良好な直線性を示した。また、PBMCおよび血漿は-20°Cで保管することで、最大4週間安定であることを確認した。

本測定法により、LC-MS/MS等の高価な分析機器を使用することなく、一般に普及しているHPLCを用いて、LC-MS/MSと同程度の感度で分析可能となり、必要な血液量を半分の8 mLまで減らすことができた。また、本測定法による血漿中濃度測定に必要な血漿量は20 μLであり、微量採血によるTDMが可能となり、患者の負担を軽減することが可能である。

本手法は、DRVの薬物動態学的研究や薬物血中濃度モニタリングの発展に貢献できる、また、DRV服用患者の有効で安全な薬物療法に貢献できると考えられる。