Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.
ノート 34(3) 281—288 (2008)

LC/MS/MSによるヒト血漿中のワルファリンとその代謝物の同時定量と光学異性体の分割定量

栗原祐子*[1a]，小野田　資[2]，竹澤正明[2]，土肥口泰生[3]，上杉恵三[1b]
エーザイ株式会社臨床研究センター薬物応用研究部臨床分析室[1]
株式会社東レリサーチセンター薬物動態研究部[2]
エーザイ株式会社臨床研究センター市販後臨床部[3]

Simultaneous Assay of Warfarin and Its Metabolites, and Assay of Warfarin Enantiomers in Human Plasma Using LC/MS/MS System

Yuko Kurihara*[1a], Motoshi Onoda[2], Masaaki Takezawa[2], Yasuo Dohiguchi[3] and Keizo Uesugi[1b]
Bioanalysis Section, Applied Drug Research, Clinical Research Center, Eisai Co., Ltd.[1]
Pharmacokinetics Research Laboratories, Toray Research Center, Inc.[2]
Post-Marketing Clinical Research Department, Clinical Research Center, Eisai Co., Ltd.[3]

(Received July 5, 2007
Accepted December 10, 2007)

Warfarin is the only oral anticoagulant used in the prevention of thromboembolism in Japan. The anticoagulant effect of warfarin is monitored by analysis of the prothrombin complex (International Normalised Ratio, INR), but in some cases, measurement of plasma warfarin concentrations is necessary.

We developed simple and sensitive LC/MS/MS methods for this purpose and validated it through assay of four warfarin monohydroxylated metabolites and warfarin enantiomers in human plasma. Preparation of samples from 0.05 mL of plasma involved simple protein precipitation using hydrochloric acid/acetonitrile. Analytes remained stable during sample processing and storage. Chromatographic separation was conducted using a chiral (CHIROBIOTIC V) column and an achiral (Symmetry Shield RP_{18}) column. No significant interference from human plasma components was observed. Assay linearity was demonstrated for all analytes with the LC/MS/MS system over the calibration range 2 to 500 ng/mL. The intra-day and inter-day assay precisions expressed as coefficients of variation (C.V.) for the quality control samples (4, 40 and 400 ng/mL) were not more than 9.0%. In conclusion, this system was considered to be reliable enough for the evaluation of pharmacokinetic profiles in planned clinical studies.

Key words —— warfarin, metabolite, enantiomer, analytical method, human plasma, LC/MS/MS

緒　言

Warfarin(以下，WFと略す)は古くから世界中で使用され，今日に至っても多くの医師に心筋梗塞症，脳梗塞症，静脈血栓症，肺塞栓症および緩徐に進行する脳血栓症といった血栓塞栓症の予防・治療薬として頻用されている薬物である[1]．

WFの薬物療法においてはINRなどの血液凝固能検査値によるモニタリングが必須であり，目標とする血液凝固能検査値の至適範囲内でも維持量が異なる．また，抗凝固作用は個人差が大きく，同一の血液凝固能検査値の至適範囲内に維持するためには，個人によって10倍以上の投与量格差があり，投与量の設定が非常に困難であ

* 文京区小石川 4-6-10；4-6-10, Koishikawa, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-8088 Japan
a 現)：エーザイ株式会社臨床研究センター推進部推進室
b 現)：エーザイ株式会社品質保証部品質保証室

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

るといわれている[1,2]．その原因はWFのPharmacokinetics(以下，PKと略す)，Pharmacodynamics(以下，PDと略す)に関与する遺伝子変異，食物中のビタミンKの摂取，併用薬との薬物相互作用，服用に際してのコンプライアンス不良等が考えられている[1-3]．

WFは主として肝細胞の粗面小胞体に存在するチトクロームP450酵素(CYP)系により酸化されて不活性な水酸化化合物に代謝される[4](**Fig. 1**)．日本で市販されている経口用WFはS-warfarin(以下，S-WFと略す)とR-warfarin(以下，R-WFと略す)の2つの光学異性体のラセミ体(1：1)として臨床で使用されている．抗凝固作用はS-WFがR-WFに対して3～5倍の強さを有する[5]．投与後にはS-WFは主にCYP 2 C 9により7-hydroxywarfarin(以下，7-OH-WFと略す)に代謝され，R-WFはCYP 1 A 2およびCYP 3 A 4によりそれぞれ6-hydroxywarfarin(以下，6-OH-WFと略す)，8-hydroxywarfarin(以下，8-OH-WFと略す)および10-hydroxywarfarin(以下，10-OH-WFと略す)に代謝される[1]．一方，近年の遺伝子多型の研究の進歩に伴い，薬物の代謝能の違いや反応性に，WFの薬理活性の高いS-WFの代謝酵素CYP 2 C 9およびWFの作用点であるビタミンKエポキシドレダクターゼ(VKORC 1)の2つの酵素の遺伝子多型が関与していることが明らかになってきた[6-9]．

WFの血漿中濃度測定は，服用しても臨床的な効果が得られないコントロール不良例の原因究明，薬物相互作用の検討，また薬物動態の検討の際に必要となる[1]．

著者らは1999年にヒト血清および血清限外ろ過液中のWF未変化体のHPLCによる測定法を報告した[10]．今回，WFの肝代謝酵素CYP 2 C 9の遺伝子多型の影響でPKに変動が予測されるS-WFおよびCYP 2 C 9の代謝産物である7-OH-WFに着目し，少量の試料でWFの代謝物および光学異性体を簡便に測定できる方法を検討し，本報告に至った．

本報では，少量のヒト血漿試料(0.05 mL)から簡便な除蛋白前処理法を経てWFラセミ体と4つの代謝物(6-OH-WF，7-OH-WF，8-OH-WF，10-OH-WF)を同時に定量する方法および，WF光学異性体を分離定量する2つの方法について検討した．その結果，良好な分析条件を確立し，定量法の信頼性を確保したので報告する．

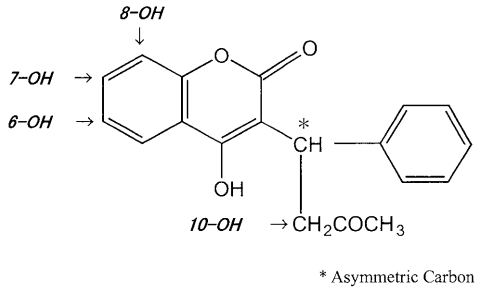

Fig. 1. Structure of Warfarin, 6-,7-,8-, and 10-hydroxywarfarin.

方　法

1. 試薬

WF，6-OH-WF，7-OH-WF，8-OH-WF，10-OH-WF(Sigma-Aldrich Corp.)はそれぞれエタノールにて溶解し100 μg/mLとした後，5種類の溶液を混合しさらにエタノールで希釈してラセミ体および代謝物測定における検量線用または既知濃度試料用標準添加液とした．同様にR-WF，S-WF(Sigma-Aldrich Corp.)はそれぞれエタノールにて溶解し100μg/mLとした後，2種類の溶液を混合しさらにエタノールで希釈し，光学異性体測定における検量線用または既知濃度試料用標準添加液とした．内標準物質として使用した*p*-chlorowarfarin(以下，Cl-WFと略す，Sigma-Aldrich Corp.)はエタノールにて溶解し500 ng/mLとした．蒸留水，アセトニトリルおよびメタノールはHPLC用を用い，1 mol/L塩酸は容量分析用を用いた．ヒト血漿は男女それぞれ3名計6名分の白人血漿((株)日本生物材料センター)および男性6名分の日本人血漿(ボランティアより採血)を用いた．

2. 測定装置および条件

1) LC/MS/MS装置

LC/MS/MS装置にはAgilent 1100-system (Agilent Technologies Inc.)およびトリプル四重極型質量分析装置4000 QTRAP (AB/MDS Sciex)を用いた．MS/MS条件自動最適化およびデータ処理ソフトはAnalyst ver. 1.4.1 (AB/MDS Sciex)を用いた．

2) LC条件

①ラセミ体WFおよび代謝物測定におけるLC条件

分析カラム；Symmetry Shield RP_{18}，2.1×150 mm，3.5μm (Waters Corp.)，移動相；A：10 mmol/L酢酸アンモニウム，B：メタノール，グラジェント0.00→2.00 min：A/B＝65/35(250μL/min)，2.00→5.00 min：A/B＝65/35→40/60 (250μL/min)，5.00→10.00 min：A/B＝40/60 (250μL/min)，10.01→13.00 min：A/B＝65/35(300 μL/min)，カラム温度；50℃，オートサンプラ注入量；5μL

②WF光学異性体測定におけるLC条件

分析カラム；CHIROBIOTIC V，4.6×250 mm，5μm (Advanced Separation Technologies Inc.)，ガードカラム：ULTRON ES-OVM.G，10×4.0 mm (Shinwa Chemical Industries, Ltd.)，移動相；メタノール/10 mmol/L酢酸アンモニウム(pH 5.0)(40/60，v/v)500μL/min，カラム温度；50℃，オートサンプラ注入量；20μL

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

3) MS/MS 条件

MS/MS 装置にはトリプル四重極型質量分析装置 4000 QTRAP(AB/MDS Sciex)を用い，負イオン検出ターボイオンスプレー法により測定を行った．スキャンモードは Multiple reaction monitoring (MRM)モードとした．ラセミ体 WF および代謝物測定法，WF 光学異性体測定法それぞれの MS/MS 条件についてプリカーサーイオンの検出，プロダクトイオンの選定，測定パラメータの最適化を行った．イオン化電圧は−4500 V，プローブ温度は 700℃に設定した．**Table 1** にラセミ体測定，光学異性体測定におけるモニタリング条件を示す．

4)試料の前処理法

血漿試料 0.05 mL に内標準溶液(Cl-WF 500 ng/mL)を 0.01 mL 添加した後，アセトニトリル 0.2 mL を加え，さらに 1 mol/L 塩酸 0.01 mL を加え 30 秒間攪拌した後に遠心分離(20,000×g，4℃，10 分)した．上清を採り 10 mmol/L 酢酸アンモニウムを 0.8 mL 加え，LC/MS/MS 注入試料とした．

5)分析法バリデーション

ラセミ体，光学異性体それぞれの測定法において，選択性，マトリックス効果，キャリーオーバーの影響，回収率，検量線の直線性，日内再現性，日差再現性，希釈による影響，血漿中の安定性，凍結融解による影響，オートサンプラ中の安定性について検討した．バリデーションは FDA ガイダンス「Guidance for industry：Bioanalytical Method Validation[11]」を参考に行った．なお，検量線パラメータ等の解析は，データ処理ソフト Analyst およびマイクロソフトエクセルを用いて行った．

結果と考察

1. 選択性

ラセミ体測定において，薬物無添加試料(ブランク試料)では WF，6-OH-WF，7-OH-WF，8-OH-WF，10-OH-WF および Cl-WF に位置する生体試料由来の妨害ピークは認められなかった．また，光学異性体測定において，R-WF，S-WF，R-Cl-WF および S-Cl-WF に位置する生体試料由来の妨害ピークは認められなかった．**Fig. 2** にラセミ体 WF とその代謝物および Cl-WF を添加した血漿から得られた MRM クロマトグラムを示した．また，**Fig. 3** に R-WF，S-WF および Cl-WF を添加した血漿か

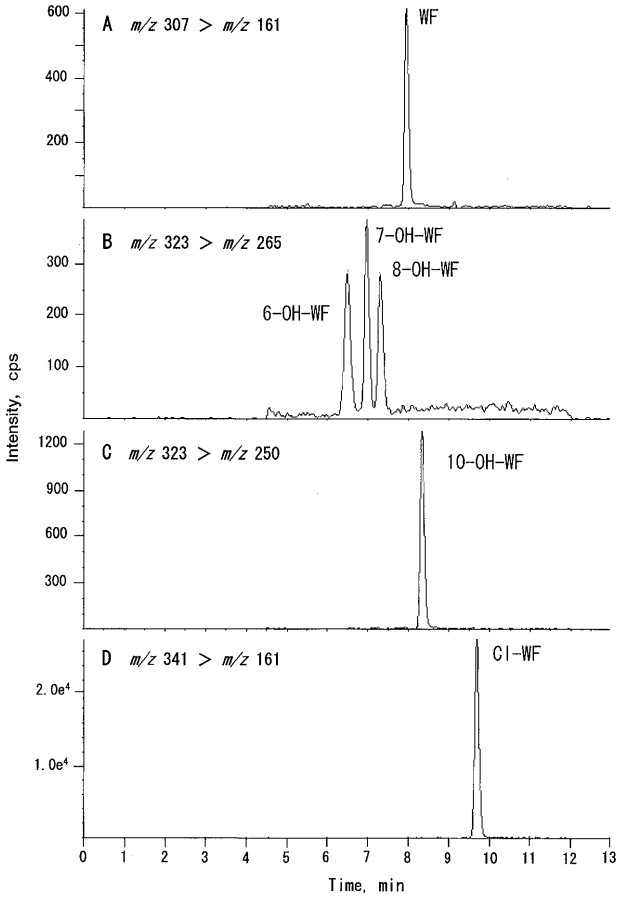

Fig. 2. Representative MRM Chromatograms of Typical Spiked Plasma Sample at 2 ng/mL of Warfarin.
(A), 6-hydroxywarfarin (B), 7-hydroxywarfarin (B), 8-hydroxywarfarin (B) and 10-hydroxywarfarin (C), and at 100 ng/mL of *p*-chlorowarfarin (D).

Table 1. MRM Parameters for the Detection of Analytes.

	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	Dwell time (msec)	DP (V)	EP (V)	CE (V)
WF	307	161	300	−60	−8	−28
6-WF-OH 7-WF-OH 8-WF-OH	323	265	300	−60	−7	−26
10-WF-OH	323	250	300	−55	−7	−26
Cl-WF	341	161	300	−60	−7	−26
R-WF S-WF	307	161	500	−60	−8	−28
R-Cl-WF S-Cl-WF	341	161	500	−60	−7	−26

DP, declustering potential; EP, entrance potential; CE, collision energy

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

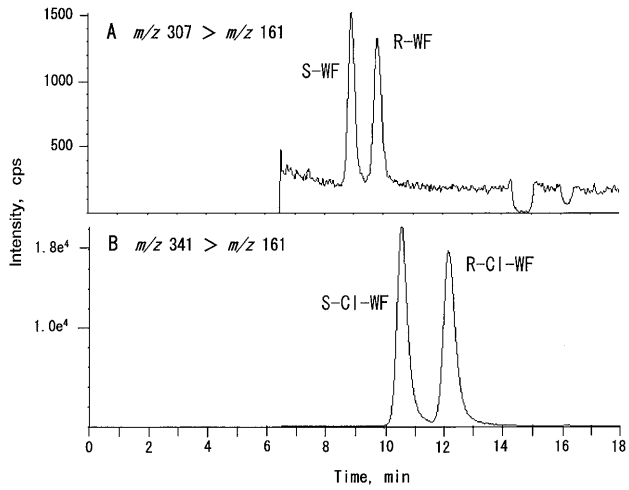

Fig. 3. Representative MRM Chromatograms of Typical Spiked Plasma Sample at 2 ng/mL of R- and S-warfarin (A), and at 100 ng/mL of *p*-chlorowarfarin (B).

ら得られたMRMクロマトグラムを示した．

2. マトリックス効果

除蛋白による前処理試料は，MS/MS装置でイオン化する過程でマトリックス効果を受けやすいことが懸念された．そのため，6名の日本人ブランク血漿と6名の白人ブランク血漿を用いてマトリックス効果および人種の違いによる影響について検討した．

日本人および白人各6名のブランク血漿に血漿中濃度が定量下限濃度2 ng/mLおよび定量上限濃度500 ng/mLとなるように試料を調製し，それぞれの濃度における真度，精度への個体差による影響について検討した．検量線には白人プール血漿を用いた．その結果，人種差および個体差は認められず，真度，精度ともに良好な結果が得られた(**Table 2**).

3. キャリーオーバーの影響

定量上限濃度試料を測定後，続いてブランク試料を測定するという一連の分析を5回繰り返し行った．各ブランク試料のWFおよび代謝物の保持時間に検出されるピークについて，定量下限濃度試料のピークの面積値に対し20%以上のピークが認められないこと，またCl-WFの保持時間に検出されるピークについて，添加試料のピークの面積値に対し5%以上のピークが認められないことを確認し，キャリーオーバーの影響はほとんどないと判断した．なお，判断基準はGuidance for industry：Bioanalytical Method Validationの選択性および定量限界の基準を参考にした．

4. 回収率

回収率は既知濃度試料と，ブランク血漿を前処理した試料に既知濃度試料と同等の標準溶液を添加した試料とを比較して算出した(n=3)．その結果，WFとその代謝物および光学異性体(4，40，400 ng/mL，Cl-WFは100 ng/mL)において，97.6～118.6%(CV値：0.3～6.8%)であった．

5. 検量線

血漿中濃度が2，5，10，20，50，100，250，500 ng/mLの試料について日を変えてn=1で5日間調製し，検量線を作成した．検量線の直線性のパラメータとして相関係数を算出した(**Table 3**)．また，得られた回帰式により各濃度の真度および精度を求めたところ良好な結果が得られた(**Table 4**).

Table 3. Coefficient of Correlation (n=5).

	coefficient of correlation
WF	>0.9976
6-OH-WF	>0.9981
7-OH-WF	>0.9980
8-OH-WF	>0.9974
10-OH-WF	>0.9971
R-WF	>0.9951
S-WF	>0.9964

Table 2. Matrix Effect (n=6).

	Japanese				Caucasian			
	2 ng/mL		500 ng/mL		2 ng/mL		500 ng/mL	
	Accuracy(%)	CV(%)	Accuracy(%)	CV(%)	Accuracy(%)	CV(%)	Accuracy(%)	CV(%)
WF	110.0	4.2	97.2	4.1	105.0	5.4	108.2	4.4
6-OH-WF	114.5	3.3	104.6	4.9	92.0	7.2	105.0	3.6
7-OH-WF	111.5	6.8	108.6	3.2	100.5	8.6	100.2	2.2
8-OH-WF	112.5	5.2	93.2	3.7	92.5	7.5	102.0	3.9
10-OH-WF	99.0	3.1	91.8	8.2	102.0	4.0	94.6	3.5
R-WF	96.5	7.4	96.2	5.8	98.5	3.7	96.6	4.2
S-WF	94.0	7.0	94.0	5.2	101.5	3.7	95.8	2.1

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

Table 4. Accuracy and Precision of Calibration Standards (n=5).

		Added concentration (ng/mL)							
		2	5	10	20	50	100	250	500
WF	Accuracy(%)	104.9	91.2	102.1	99.1	98.7	102.6	103.9	101.4
	CV(%)	1.5	3.2	2.0	3.4	1.5	1.8	3.2	4.4
6-OH-WF	Accuracy(%)	103.1	92.9	102.6	101.4	99.2	102.8	102.0	98.7
	CV(%)	1.6	2.8	2.0	2.1	2.7	1.7	4.5	1.9
7-OH-WF	Accuracy(%)	102.3	94.4	103.7	99.3	99.3	103.6	102.8	97.8
	CV(%)	1.7	3.6	4.3	1.9	4.1	2.1	4.9	2.4
8-OH-WF	Accuracy(%)	102.2	96.3	100.5	99.9	100.0	103.4	103.0	98.4
	CV(%)	1.9	6.1	4.9	4.6	3.1	3.2	6.2	4.3
10-OH-WF	Accuracy(%)	103.1	92.9	102.7	100.5	100.7	104.4	103.0	96.6
	CV(%)	1.6	2.6	2.7	1.9	0.6	1.7	6.5	5.2
R-WF	Accuracy(%)	102.7	93.4	101.3	101.8	100.8	100.3	101.8	101.2
	CV(%)	2.8	6.3	2.9	2.9	1.3	3.8	1.4	5.9
S-WF	Accuracy(%)	102.3	94.1	103.0	103.4	100.0	101.4	100.2	99.0
	CV(%)	3.4	7.0	3.4	1.1	0.9	3.3	1.9	5.1

6. 既知濃度試料における真度，精度

血漿中の定量下限濃度試料および定量範囲内の既知の3濃度水準(4，40，400 ng/mL)における日内再現性，日差再現性について検討した．その結果，真度，精度ともに良好な結果が得られた(**Table 5**).

7. 希釈による影響

血漿中に定量上限以上の濃度になるように調製した試料(4000 ng/mL)を10倍希釈した後に真度および精度を求めることにより，希釈による影響を検討した．その結果，真度，精度ともに良好な結果が得られた(Table 5).

8. 安定性

血漿に4および400 ng/mLとなるようにラセミ体WFとその代謝物を添加した試料，また別にR-WF，S-WFを添加した試料について，各条件下に保存し残存率を求めた．その結果，凍結融解を5回繰り返した後の残存率はいずれの化合物においても安定であり，90.8%以上で

Table 5. Intra- and Inter-assay Accuracy and Precision, and Intra-day Dilution Integrity.

	2 ng/mL		4 ng/mL		40 ng/mL		400 ng/mL		400[a] ng/mL	
	Accuracy(%)	CV(%)	Accuracy(%)	CV(%)	Accuracy(%)	CV(%)	Accuracy(%)	CV(%)	Accuracy(%)	CV(%)
Intra-assay (n=5, 5-batch)										
WF	101.0-108.0	2.4-6.0	97.3-108.0	1.8-4.2	91.3-109.5	2.4-4.0	96.8-105.5	0.6-3.8	108.5	1.6
6-OH-WF	96.0-112.0	1.8-10.6	101.3-113.3	2.2-5.7	102.3-106.8	2.6-4.4	93.5-107.8	1.6-5.0	98.0	2.6
7-OH-WF	93.5-113.5	3.1-7.9	94.8-106.8	3.7-7.8	96.3-108.5	1.3-4.7	91.5-110.0	2.0-4.0	100.5	3.1
8-OH-WF	95.5-110.0	6.0-14.1	95.0-107.5	4.1-9.0	101.0-107.5	2.3-3.8	94.5-103.8	1.9-6.1	96.5	2.4
10-OH-WF	96.0-104.0	1.8-6.0	94.3-102.0	2.9-5.9	93.5-108.8	1.2-3.7	91.5-95.0	1.8-6.5	98.5	7.3
Inter-assay (5 days, n=25)										
WF	105.0	4.4	103.3	4.9	103.8	7.0	99.5	4.1		
6-OH-WF	104.0	9.3	105.8	5.7	104.0	3.5	98.8	5.9		
7-OH-WF	105.5	8.6	100.5	7.1	102.3	4.7	97.3	7.6		
8-OH-WF	100.5	10.5	101.0	7.9	104.5	3.6	98.8	4.6		
10-OH-WF	100.0	5.4	98.3	4.5	101.0	5.4	93.8	4.3		
Intra-assay (n=5, 5-batch)										
R-WF	95.5-105.5	4.7-7.0	97.3-103.0	2.6-5.9	95.5-105.8	2.8-5.6	94.3-102.8	0.8-3.8	92.3	5.4
S-WF	95.5-115.5	2.9-8.5	99.8-105.0	0.9-5.9	98.5-106.5	3.1-3.8	95.0-104.5	0.7-3.6	94.8	2.3
Inter-assay (5 days, n=25)										
R-WF	101.0	7.3	99.5	4.4	99.5	5.4	96.8	4.2		
S-WF	104.5	8.6	102.5	3.7	101.5	4.2	98.0	4.3		

a Samples at 4000 ng/mL were diluted 10-fold with blank plasma prior to analysis.

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

あった．室温2日間保存では，すべての化合物が安定であり，残存率は97.5%以上であった．長期凍結(−15℃以下)保存では10-OH-WFを除いて6カ月間安定であり，残存率は90.6%以上であった．10-OH-WFは3カ月間安定であり，残存率は101.9%以上であった．また，血漿試料を前処理した試料をオートサンプラ中で96時間保存した時，すべての化合物で安定であり残存率は93.2%以上であった(**Table 6**).

9. 従来法との比較

本法は前処理法の簡便さ，血漿使用量(0.05 mL)，感度(定量限界2 ng/mL)，同時に多くの情報が得られる点から，従来法より優れていると考えられる．これまで血漿，尿または肝ミクロゾーム中のラセミ体WFと代謝物の同時定量法として，HPLC法[6,12]やLC/MS，LC/MS/MSを用いた方法[13−15]が報告されている．血漿中濃度測定における試料の前処理は有機溶媒による抽出あるいは固相抽出等の煩雑な操作を必要とし，回収率は約70〜100%であった．これらの測定法は血漿1 mLほどを使用するため，臨床薬物動態試験等の経時採血における被験者の負担は大きい．定量下限濃度はWFラセミ体として十数〜数十ng/mLであり，感度は必ずしも高くない．

一方，血漿中のWF光学異性体の分離定量法としてはHPLC法[3,6,16,17]およびLC/MS/MS法[18,19]が報告されている．いずれの方法も前処理法として有機溶媒による抽出が用いられ，回収率は約80〜100%であった．定量下限濃度は検出器と血漿量によりさまざまであり，0.1〜0.25 mLの血漿から抽出した場合は，HPLC，LC/MS/MSに関わらず十数〜百ng/mLであった．LC/MS/MS法を用いた定量下限濃度が1 ng/mLの高感度分析の報告もあるが血漿1 mLを必要とする．最近ではLC/MS/MSを用い，簡便な除蛋白による前処理法で血漿0.25 mLと比較的少ない試料での測定も報告[7]されているが，定量下限濃度は125 ng/mLであり，必ずしも高感度ではない．また，光学異性体とWFラセミ体と4つの代謝物の測定を同時に検討した方法も報告[6]されているが，有機溶媒による前処理を経てHPLC法で測定し，定量下限は数十ng/mL，回収率は未変化体が約60%，代謝物は約40〜90%であった．光学異性体とラセミ体の同時検討にLC/MS/MSを用いた方法の報告はこれまでない．

10. 測定範囲の設定

健康成人にWFを1 mg投与した際の薬物動態を検討した嶋瀬らの報告[20]によると，投与後約30分で最高血漿中ラセミ体濃度(約150 ng/mL)に達し，投与後の最終測定ポイントである96時間後の血漿中濃度は約20 ng/mLであった．Kingらの報告[21]によると，2 mg，5 mg，10 mg投与した際の血中半減期はそれぞれ71，47，41時間であり，投与量によって半減期が異なっていた．また，光学異性体の動態パラメータはS-WFとR-WFで異なり，S-WFの半減期はR-WFより短いこと，血漿中の存在比率(S/R)はCYPの遺伝子多型などの影響により0.37〜1.25の範囲で異なることが知られている[1,22,23]．これらの報告から，動態パラメータを算出するために必要な定量範囲を検討し，さらに個体差を考慮した結果，WF未変化体の定量下限濃度はラセミ体として約5 ng/mL，光学異性体は2〜3 ng/mLとすることにより，投与量1〜2 mg(成人の一般的投与量は2〜6 mg/day)においても十分に薬物動態パラメータを検討できると考え，ラセミ体，光学異性体ともに定量下限濃度は2 ng/mLに設定した．定量上限濃度は検量線の直線性における基準値を満足する範囲で設定し，500 ng/mLとした．一方，INRを至適範囲内にコントロールした患者(日本人)におけるラセミ体血漿中濃度は，投与量1〜4 mg/dayにおいて約400〜1700 ng/mLとの報告がある[24]．したがって，治療中の血漿濃度測定の際はラセミ体濃度が定量上限を超える場合が予測されるが，本法は500 ng/mLを超える試料について，10倍希釈による真度，精度への影響

Table 6. Stability of Spiked Plasma Samples at 4 and 400 ng/mL.

	Residual rate (%)						
	WF	6-OH-WF	7-OH-WF	8-OH-WF	10-OH-WF	R-WF	S-WF
Freeze and thaw[a] (5-cycle)	99.5-99.7	104.8-108.9	95.0-101.1	104.9-105.8	90.8-101.6	92.8-94.6	94.0-101.0
Short-term[a] (48 hr at room temperature)	100.5-108.5	104.3-109.4	98.1-104.0	100.5-110.0	98.8-99.7	98.3-98.5	97.5-99.5
Long-term[a] (3 months below -15°C)	106.6-108.8	100.0-105.8	96.7-105.4	96.7-98.7	101.9-103.7	92.9-103.6	88.0-100.7
(6 months below -15°C)	98.0-98.4	90.6-94.3	91.5-98.9	95.8-103.8	82.6-83.6	109.3-110.0	100.5-105.0
Post-preparative[b] (96 hr at 10°C)	100.3-102.6	100.0-100.3	100.0-103.0	101.3-101.6	99.5-99.7	93.2-99.0	100.7-102.0

a n=3
b n=5

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

がないことを検証済である．また，Locatelliらの報告[6]によるとWF治療中(6カ月以上)でINRを2.0～3.5に保持(投与量：0.75～20 mg)した場合の代謝物の投与後12～16時間の平均血漿中濃度(n＝204)は，7-OH-WFが154.2±73.1 ng/mLであり全例中52%で確認された．また，10-OH-WFは145.9±85.5 ng/mLであり19%で確認された．6-OH-WFおよび8-OH-WFはLocatelliらの方法における定量限界(25 ng/mL)で定量可能であった例は2～3%にすぎないが，6-OH-WFは17%で検出されていた．これらの報告より，代謝物の定量範囲は未変化体と同濃度の設定で問題ないと判断し，2～500 ng/mLとして検討した．

11. まとめと今後の課題(臨床への応用)

今回，WFとCYP 2 C 9およびVKORC 1の遺伝子多型のPK，PDへの影響に関する臨床試験の実施計画を考慮し，本定量法を確立した．本法は，ヒト血漿中のラセミ体WFおよび代謝物濃度の同時測定法，光学異性体分割定量法として，2～500 ng/mLの濃度範囲における分析法バリデーションの検討項目(選択性，マトリックス効果，キャリーオーバーの影響，回収率，検量線の直線性，日内再現性，日差再現性，希釈による影響，安定性)において良好な結果を得た．

本法は，使用する血漿試料量が0.05 mLと非常に少なく，除蛋白法による前処理で非常に簡便かつほぼ100%回収される方法である．臨床試験におけるPK解析のための血漿中濃度測定法として十分活用できる方法である．また，一回の前処理で得た分析試料は試料調製後96時間以内であれば代謝物を含むWFラセミ体と光学異性体の2つのLC/MS/MS測定系で活用でき，少量の血漿試料から一度の前処理操作で多くの情報が得られる．今後は大量の試料を短時間に処理するための方法として，96-well用のfilterを用いて蛋白変性試料をろ過することにより除蛋白操作を簡便にする手法や，さらに自動分注装置を用いた除蛋白操作への応用も可能である．また，本法はLC/MS/MS法であるため，高い特異性が確保されていると思われるが，WFの併用薬およびその代謝物に対する特異性は未検討であるため，今後の課題としてあげる必要がある．

WF投与後の体内動態において，薬理活性の高いS-WFは主としてCYP 2 C 9によって代謝されるため，CYP 2 C 9の遺伝子変異によりS-WFの代謝が影響を受ける．CYP 2 C 9変異型の頻度は日本人では約4%で，S-WFの代謝能は野生型に対して，変異型のヘテロ型の場合では1/3，変異型のホモ型では1/10程度に低下するとの報告がある[25]．主な薬理活性体であるS-WF血中濃度の個人差は，結果として血液凝固能への反応性に違いをもたらすことが想定され，WFの測定においては，S-WFとR-WFを分離定量し，S-WFの濃度推移を把握することが重要であると考える．また，CYP 2 C 9遺伝子多型はS-WFの代謝経路に関与することから，S-WFの主代謝物である7-OH-WFにおいても薬物動態の変動が予想される．一方，R-WFはCYP 1 A 2により6-OH-WFと8-OH-WF，CYP 3 A 4により10-OH-WFに代謝され，複数のCYPが関与する．R-WFの動態パラメータを評価するだけでなく，代謝物それぞれの動態パラメータを*in vivo*で確認することは，薬物相互作用を考察する上で参考になる．

今後，WFと遺伝子多型に関する臨床試験において，遺伝子変異によるPKの変動，またはPDへの影響を知ることは，WF療法の課題である投与量および血液凝固能反応性の個人差の要因解明に進展をもたらすと考える．そして将来，WF治療における適切な導入期投与量の設定へとつながる可能性がある．

引用文献

1) J. Hirsh, J.E. Dalen, D.R. Anderson, L. Poller, H. Bussey, J. Ansell, D. Deykin, J.T. Brandt, Oral anticoagulants : mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range, *Chest*, **114**, 445S–469S (1998).
2) J. Ansell, J. Hirsh, L. Poller, H. Bussey, A. Jacobson, E. Hylek, The Pharmacology and Management of the Vitamin K Antagonists : The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy, *Chest*, **126**, 204S–233S (2004).
3) A. Osman, K. Arbring, T.L. Lindahl, A new high-performance liquid chromatographic method for determination of warfarin enantiomers, *J. Chromatogr. B*, **826**, 75–80 (2005).
4) H.G.M. Shetty, A.G. Fennerty, P.A. Routledge, Clinical pharmacokinetic consideration in the control of oral anticoagulant therapy, *Clin. Pharmcokinetics*, **16**, 238–253 (1989).
5) H. Takahashi, H. Echizen, Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications, *Clin. Pharmackinetics*, **40**, 587–603 (2001).
6) I. Locatelli, V. Kmetec, A. Mrhar, I. Grabnar, Determination of warfarin enantiomers and hydroxylated metabolites in human blood plasma by liquid chromatography with achiral and chiral separation, *J. Chromatogr. B*, **818**, 191–198 (2005).
7) G. Vecchione, B. Casetta, M. Tomaiuolo, E. Grandone, M. Margaglione, A rapid method for the quantification of the enantiomers of warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol by two-dimensional-enantioselective liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **850**, 507–514 (2007).
8) E.A. Sconce, T.I. Khan, H.A. Wynne, P. Avery, L. Monkhouse, B.P. King, P. Wood, P. Kesteven, A.K.

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

Daly, F. Kamali, The impact of CYP 2 C 9 and VKORC 1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements : proposal for a new dosing regimen, *Blood*, **106**, 2329–2333 (2005).

9) M.J. Rieder, A.P. Reiner, B.F. Gage, D.A. Nickerson, C.S. Eby, H.L. McLeod, D.K. Blough, K.E. Thummel, D.L. Veenstra, A.E. Rettie, Effect of VKORC 1 Haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose, *New Engl. J. Med.*, **325**, 2285–2293 (2005).

10) 栗原祐子，上杉恵三，栢野正則，土肥口泰生，深山伸行，セミミクロカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーーカラムスイッチングシステムによるヒト血清および血清限外ろ過液中のワルファリンの定量，病院薬学，**25**, 169–175 (1999).

11) Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine (2001).

12) H. Takahashi, T. Kashima, S. Kimura, N. Muramoto, H. Nakahata, S. Kubo, Y. Shimoyama, M. Kajiwara, H. Echizen, Determination of unbound warfarin enantiomers in human plasma and 7-hydroxywarfarin in human urine by chiral stationary-phase liquid chromatography with ultraviolet or fluorescence and on-line circular dichroism detection, *J. Chromatogr. B*, **701**, 71–80 (1997).

13) M. Ufer, B. Kammerer, J. Kirchheiner, A. Rane, J.O. Svensson, Determination of phenprocoumon, warfarin and their monohydroxylated metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B*, **809**, 217–226 (2004).

14) Z.Y. Zhang, B.M. King, Y.N. Wong, Quantitative liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry warfarin assay for in vitro Cytochrome P 450 Studies, *Anal. Biochem.*, **298**, 40–49 (2001).

15) D.C. Spink, K.M. Aldous, L.S. Kaminsky, Analysis of oxidative warfarin metabolites by thermospray high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, **177**, 307–313 (1989).

16) P.R. Ring, J.M. Bostick, Validation of a method for the determination of (R)-warfarin and (S)-warfarin in human plasma using LC with UV detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **22**, 573–581 (2000).

17) W. Naidong, J.W. Lee, Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of warfarin enantiomers in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11**, 785–792 (1993).

18) R.A. Coe, J.O. Rathe, J.W. Lee, Supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry for fast bioanalysis of R/S-warfarin in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **42**, 573–580 (2006).

19) W. Naidong, P.R. Ring, C. Midtlien, X. Jiang, Development and validation of a sensitive and robust LC-tandem MS method for the analysis of warfarin enantiomers in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25**, 219–226 (2001).

20) 嶋瀬棟正，梅下伸也，梅田直樹，中川祥子，低用量ワルファリンカリウム錠の開発，*Medical Postgraduates*, **41**, 143–157 (2003).

21) S-Y.P. King, M.A. Joslin, K. Raudibaugh, H.J. Pieniaszek, Jr., I.H. Benedek, Dose-Dependent Pharmacokinetics of Warfarin in Healthy Volunteers, *Pharmaceutical Research*, **12**, 1874–1877 (1995).

22) X. Jiang, K.M. Williams, W.S. Liauw, A.J. Ammit, B. D. Roufogalis, C.C. Duke, R.O. Day, A.J. McLachlan, Effect of ginkgo and ginger on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy subjects, British Journal of Clinical Pharmacology, **59**, 425–432 (2005).

23) K. Obayashi, K. Nakamura, J. Kawana, H. Ogata, K. Hanada, M. Kurabayashi, A. Hasegawa, K. Yamamoto, R. Horiuchi, VKORC 1 gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **80**, 169–178 (2006).

24) 仮屋薗博子，中村和男，本屋敏郎，石橋丸應，豊平均，下川新二，平明，ワルファリンの血中濃度と凝固能(PT，TT，HPT)との相関，医薬ジャーナル，**28**, 1193–1203 (1992).

25) H. Takahashi, T. Kashima, Y. Nomizo, N. Muramoto, T. Shimizu, K. Nasu, T. Kubota, S. Kimura, H. Echizen, Metabolism of warfarin enantiomers in Japanese patients with heart disease having different CYP 2 C 9 and CYP 2 C 19 genotypes, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **63**, 519–528 (1998).

NII-Electronic Library Service