

LC/MS/MSを用いたクロザピンおよび2種の代謝物の新規血漿中濃度測定法の構築

佐藤 紀宏¹、鈴鹿 雅人¹、佐藤 祐司¹、岩淵 理子¹、小林 大典¹、小倉 次郎¹、高崎 新也¹、横田 真希²、塚本 多矩³、早川 禎宏³、菊地 正史^{1,2}、前川 正充^{1,2}、眞野 成康^{1,2}
¹東北大学病院薬剤部、²東北大学薬学部、³島津製作所



Pharmaceutical

■ 要旨

クロザピンおよび代謝物の血漿中濃度をもとにした治療薬物モニタリング (TDM) が推奨されており、本邦でもその有用性の検証が進められています。

東北大学病院薬剤部では、精神科との共同で、クロザピンを含む種々の向精神薬のTDMの有用性を検証するための臨床研究を実施しています。本研究の一環で、クロザピンおよび2種の代謝物のTDMの有用性を検証すべく、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による、新規血漿中濃度測定法を構築しました。

1. はじめに

クロザピンは治療抵抗性統合失調症に適応を持つ唯一の治療薬であり、1989年に欧米で承認されました (図1 (A))。日本では2009年に承認され、臨床使用されるようになりました。クロザピンの重篤な副作用として、無顆粒球症、発作、体重増加等が報告されており、これらの副作用発現がクロザピンの投与量や代謝物の血中濃度と関連することが知られています¹⁻³⁾。

精神科領域におけるTDMに関するガイドライン「The Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie consensus guidelines」⁴⁾では、クロザピンのTDMの実施が強く推奨されています。日本臨床精神神経薬理学会が本ガイドラインの和訳をホームページに掲載しており、本邦でも広く認識されるようになってきました。現在では、日常診療における向精神薬のTDM実施を目指して、その有用性の検証が進められています。

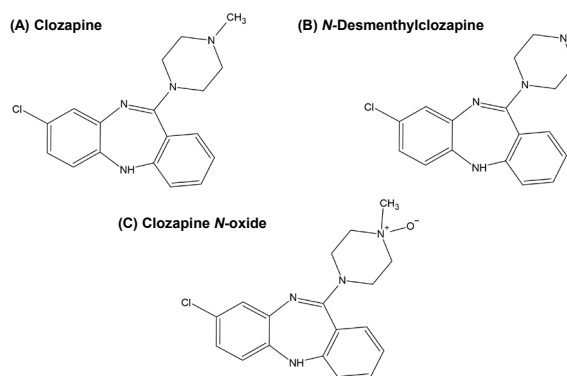


図1. クロザピン、*N*-デスマチルクロザピンおよびクロザピン*N*-オキシドの化学構造

クロザピンは薬物代謝酵素チトクロムP450 (CYP) によって、*N*-デスマチルクロザピン (norCLZ)、およびクロザピン*N*-オキシド (CNO) に代謝されます (図1 (B)、(C))⁵⁻⁷⁾。一部の研究グループが、クロザピンの血漿中濃度と薬物代謝酵素の活性に影響を及ぼす一塩基多型 (SNPs) との相関解析を行いました^{8, 9)}。日本人を対象とした解析は症例数が限られているものの、このような研究においても、クロザピンと代謝物の血中濃度分析法が必要になります。

臨床現場で有用な、薬物血中濃度測定法の開発に際して、単に有効血中濃度範囲における測定にとどまらず、薬物併用による相互作用や薬物代謝酵素等の遺伝的要因に基づく

血中濃度上昇等にも対応可能な、広範囲の測定を可能とする測定法が求められます。

最近、我々のグループが報告した、イオン源で衝突励起解離を引き起こすインソースCID (Collision Induced Dissociation) による測定対象プリカーサイオン量調節を利用した検量線範囲の調節手法は、こうした多種の薬物及び代謝物の一斉分析に応用可能で、多くの疾患領域で、薬物血中濃度分析に応用されてきました¹⁰⁻¹⁴⁾。この手法は、オリフィス後方のイオンガイド電圧であるQarrayバイアスを調節することによって四重極が作る電場に流入するイオン量を調節する技術です。

今回、精神科領域において、インソースCIDによるイオン量調節を利用したクロザピンと代謝物の血中濃度測定法を開発した¹⁵⁾ので、本アプリケーションノートで紹介いたします。

2. クロザピンおよび代謝物の血中濃度分析法の開発

血中濃度分析法の開発にあたり、1.「分析法の開発」、2.「開発した分析法の評価」、3.「実サンプル分析への応用」の三つの項目に分割し、段階的に検討を行いました。以下に各項目の概要を述べます。

1. 「分析法の開発」

分析機器には、島津製作所のLCMSTTM-8050トリプル四重極質量分析計およびNexeraTM超高速液体クロマトグラフシステムを組み合わせて用いました。測定対象化合物の分離分析にはUHPLC PEEK column InertSustain C18 (50 mm × 2.1 mm i.d., 3 μm, GL Sciences, Inc., Tokyo)を用い、カラムオープン¹⁶⁾は40° Cとしました。移動相にはA: 10 mmol/Lギ酸アンモニウム in Water (pH3.6) およびB: 10 mmol/Lギ酸アンモニウム in MeOH (pH3.6) の混液 (A:B=1:1, v/v) を用い、流速は0.4 mL/minとしました。データ解析にはLabSolutions software (version 5.97, Shimadzu Co.)を用いました。選択反応モニタリング (SRM) パラメータの最適化は、前川らの報告¹³⁾に従って行いました (表1)。

表1 各化合物の最適化SRM/パラメータ

Compound	Q1 (m/z)	CE (V)	Q3 (m/z)	Internal standard
Clozapine	327.0	40	192.1	Clozapine-d ₈
N-Desmethylclozapine	313.1	40	192.1	Clozapine-d ₈
Clozapine N-oxide	343.1	40	192.1	Clozapine-d ₈
Clozapine-d ₈	335.1	47	192.2	-

CE, collision energy

続いて、ネブライザーガス、ドライイングガス、ヒーティングガスの調節を行い、最適値として、それぞれ3 L/min、10 L/min、および10 L/minを得ました。また、インターフェイス温度、DL (Desolvation Line) 温度、ヒートブロック温度、およびインターフェイス電圧はそれぞれ、300°C、250°C、400°C、および4000 Vとし、陽イオンモードで測定を行うこととしました。

次に、インソースCIDによるイオン量調節を行いました。各化合物10 ng/mLの溶液を1 μL注入し、Qarrayバイアスを0 Vから180 Vの範囲で変化させた時のピーク強度を調べました (n=5)。また、各化合物について、0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10, 30, 100, 300, 1,000, 3,000, および10,000 ng/mL (レベル1~11) の検量線サンプルを1 μL注入し、Qarrayバイアスを0 Vから180 Vまで変化させた時の検量線の直線範囲を調べました。なお、検量線サンプルはすべて1 μg/mL内標準物質 (IS) を含むメタノール溶液として調製しました。検量線の直線範囲の評価には、以下の基準を設けました。1) 質量分析計の検出器のシグナル強度に飽和が見られた場合、その検量点は除外した。2) 5回測定の結果標準偏差が20%以内のものを含め、検量点として含めました。

以上の検討の結果、CLZの検量線範囲はQarrayバイアスが120Vのとき、検量線が最も広範囲で直線性を示しました (図2)。その他の化合物については、Qarrayバイアスを変化させることによって、検量線の直線範囲を拡大するこ

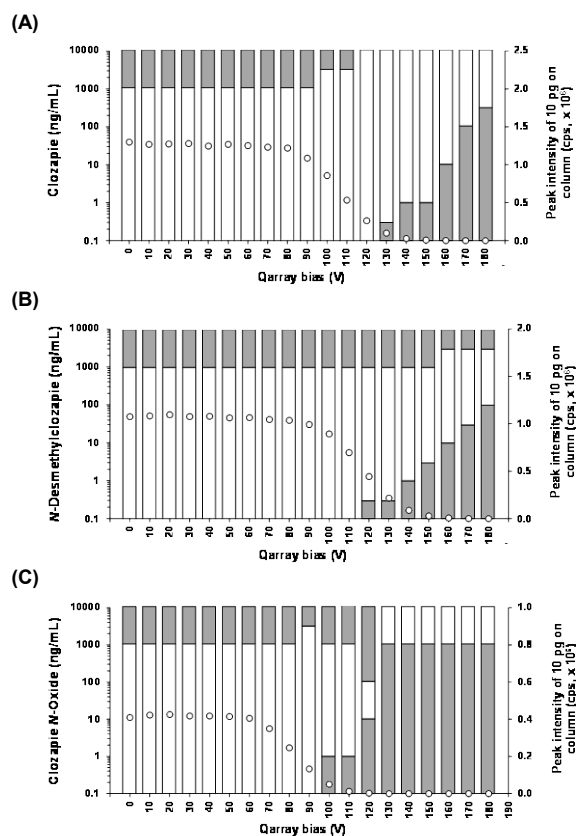


図2. 各Qarrayバイアスにおける (A) クロザピン、(B) N-デスメチルクロザピン、および (C) クロザピンN-オキシドのピーク強度と検量線範囲の変化

とができませんでした (図2)。よって、CLZ、norCLZ、CNO、およびISのQarrayバイアスはそれぞれ120 V、0 V、0 V、0 Vとしました。

2. 「開発した分析法の評価」

ストック溶液を希釈し、ヒト血漿と混合することで検量線サンプルとQuality controls (QCs)を調製しました。検量点は5、15、50、150、500、1,500、5,000および10,000 ng/mL としました。QCはthe lower limit of quantification (LLOQ)、low quality control (LQC)、middle quality control (MQC)、およびhigh quality control (HQC)をそれぞれ、5、10、250、および8,000 ng/mLとしました。

LC/MS/MS分析のためのサンプル調製は以下の手順で行いました。

- 25 μLのサンプルを1.5 mLマイクロチューブに取り、等量のエタノールで希釈する。
- 25 μLの1 μg/mL IS溶液と75 μLのアセトニトリルを添加する。
- 混合液をボルテックスミキサーでよく混合する。
- 14,000 × g、5 min、room temperature (Room Temp., approximate 20° C)の条件で遠心分離機にかける。
- 上清を50 μL、新しい1.5 mLチューブに秤取し、75 μLの水で希釈する。
- よく混合したサンプルのうち100 μLを測定用サンプルバイアルに移す。

上記手順で調製した検量線及びQCサンプルを用いて、今回開発した測定法のバリデーションを試みました。測定法のバリデーションはthe US Food and Drug Administration (2018) guidelinesに従いました。

測定法の再現性は、QCサンプル4点 (LLOQ、LQC、MQC、およびHQC) を異なる3日間に各6回測定することで評価しました。日内日間再現性はcoefficient of variance (CV%)を算出することで評価しました。選択性評価には6つの異なるロットのヒトブランク血漿を用いて評価しました。

安定性評価は、LQCおよびHQC (n = 3)をそれぞれ、室温で6および18時間、4° Cで1、3、および7日間、-30° Cで2週間、1、および2ヶ月間保管した後と、3回の凍結融解後の測定値を用いて評価しました。マトリックス効果は、MQCを用いて、ヒト血漿添加の有無の測定値への影響により評価しました。すべての測定対象化合物の検量線の相関係数(r)は0.99以上と良好な結果が得られました。日内日間再現性試験の結果、本法は84.6-114.8%の正確さを示し、日間および日内測定の精度はそれぞれ≤9.1%および≤9.9%でした(表2)。6つの異なるロットのヒトブランク血漿には干渉するピークが見られず、本測定法の選択性に問題はありませんでした。安定性試験の結果、CLZおよび代謝物は室温で18時間、4° Cで7日間、-30° Cで2ヶ月間安定でした(表3)。また、サンプルの凍結融解作業においても安定でした(表3)。すべての条件において残存率は82.7%から114.7%の範囲に収まりました。MQCサンプルのマトリックス効果を評価した結果、CLZ、norCLZ、およびCNOのヒト血漿有無によるピーク面積比(%)の変化はそれぞれ、98.1%、94.9%、および102.5%でした。

以上の結果より、本測定法によるヒト血漿中のCLZ、norCLZ、およびCNO濃度測定を問題なく実施可能であることが示されました。

表2 クロザピンおよび代謝物の血中濃度分析における日内・日間の再現性評価

Concentration levels	Intra-day precision (CV, %)	Intra-day accuracy (%)	Inter-day precision (CV, %)	Inter-day accuracy (%)
Clozapine				
LLOQ	≤ 8.6	89.9-114.8	≤ 6.9	91.2-114.8
LQC	≤ 5.3	90.0-110.7	≤ 9.9	86.1-109.7
MQC	≤ 2.5	88.4-98.5	≤ 4.5	88.4-97.3
HQC	≤ 3.9	86.4-97.4	≤ 4.7	86.9-97.8
N-Desmethylclozapine				
LLOQ	≤ 6.0	90.2-108.0	≤ 6.8	88.0-109.0
LQC	≤ 9.1	89.2-112.2	≤ 7.0	87.8-113.7
MQC	≤ 4.6	85.5-99.7	≤ 4.4	85.9-96.8
HQC	≤ 4.7	85.4-104.9	≤ 4.7	85.1-111.9
Clozapine N-oxide				
LLOQ	≤ 7.6	84.6-111.4	≤ 7.6	84.6-110.3
LQC	≤ 9.1	86.2-112.3	≤ 8.0	86.1-106.3
MQC	≤ 2.7	85.1-113.5	≤ 3.7	90.7-98.5
HQC	≤ 3.5	85.1-106.9	≤ 3.5	85.4-97.4

表3 クロザピンおよび代謝物の血中濃度分析における各化合物の安定性評価

Levels	Clozapine (%)	N-Desmethylclozapine (%)	Clozapine N-oxide (%)
6h at r.t.			
LQC	95.9-102.8	112.3-114.7	92.2-105.5
HQC	97.5-101.0	97.0-98.9	95.6-97.6
18h at r.t.			
LQC	91.7-95.3	97.3-102.7	82.7-88.4
HQC	93.6-99.0	92.8-96.9	91.3-95.7
1 day at 4° C			
LQC	95.6-100.1	98.2-103.4	95.0-97.4
HQC	98.1-99.5	90.3-96.3	92.3-94.9
3 days at 4° C			
LQC	92.5-101.3	100.1-104.4	97.5-103.7
HQC	93.1-95.0	90.5-92.3	85.2-88.5
7 days at 4° C			
LQC	93.9-99.7	95.1-103.9	93.2-102.1
HQC	93.4-95.6	93.5-97.4	86.0-88.2
2 weeks at -30° C			
LQC	96.1-101.4	96.8-103.5	93.5-99.7
HQC	94.6-95.5	94.2-94.4	93.8-95.5
1 month at -30° C			
LQC	91.6-94.8	97.7-98.5	89.7-100.9
HQC	92.2-94.6	91.8-92.5	87-89
2 months at -30° C			
LQC	94.4-104.6	97.9-108.7	93.5-99.7
HQC	94.7-98.2	101.8-104.0	100.5-102.9
Freeze-thaw			
LQC	96.1-102.1	101.0-101.7	95.1-101.2
HQC	93.2-94.2	96.5-96.9	93.6-97.8

HQC, high quality control; LQC, low quality control; r.t., room temperature

3. 「実サンプル分析への応用」

次に、今回開発した血中濃度分析法を用いて、ヒト血中のクロザピンと代謝物濃度を実際に測定しました。東北大学医学系研究科倫理委員会の承認を得た後、同意取得の上、ヒトの血液サンプルを収集し、本研究に用いました(承認番号: 2021-1-191)。今回用いた血液サンプルは、クロザピン投与直前(C0)および投与後4時間経過時(C4≡Cmax)に採取しました。ヘパリン採血管で採取した血液を、1,580 × g、10 min、4° Cの条件で遠心分離し、血漿を得ました。得られた血漿は測定まで-80° Cで保管し、2週間以内に分析しました。

治療抵抗性統合失調症患者2例より得られた検体を用いて、クロザピンと代謝物の定量を試みた結果、血中濃度を測定可能でした。患者の血中クロザピンと代謝物濃度は表4に示した通りです。患者1のクロザピンのトラフ濃度は既報の治療域(350-600 ng/mL)に収っていました。患者2では、投与4時間後のクロザピンと代謝物すべての血中濃度を定量可能でした。

表4 治療抵抗性統合失調症患者のクロザピンおよびその代謝物濃度

Patient number	Sex	Body weight (kg)	Dose (mg/day)	Sampling point	Analyte	Concentration (ng/mL)
1	Male	61.6	200	C0	Clozapine	316
					N-Desmethylclozapine	182
					Clozapine N-oxide	42
2	Female	42.6	300	C4	Clozapine	717
					N-Desmethylclozapine	262
					Clozapine N-oxide	88

C0, trough; C4, 4h after administration

3. おわりに

本研究では、インソースCIDによるイオン量調節を利用した検量線範囲の調節手法を用い、クロザピンとその代謝物の新規血中濃度分析法を開発しました。本分析法の開発に際して、インソースCIDによるイオン量調節、すなわち、Qarrayバイアスを0 Vから180 Vの間で変化させることによって、検量線範囲とその直線性を詳細に評価しました。

LC/MS/MSを用いた、クロザピンと代謝物の分析法について先行研究がありましたが^{8,9)}、血中濃度が大きく上昇した場合の測定精度が不十分と考えられました。本分析法は、有効血中濃度域の測定に有用なだけにとどまらず、薬物併用による相互作用や薬物代謝酵素等の遺伝的要因に基づく血中濃度上昇等にも十分に対応可能と考えられます。今後、臨床現場におけるTDMや薬物動態解析研究等に有用なツールとなることが期待されます。

<参考文献>

- Gerson, SL, Arce, C., & Meltzer, HY. (1994). N-Desmethylclozapine: A Clozapine metabolite that suppresses haemopoiesis. *British Journal of Haematology*, 86, 555-561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1994.tb04786.x>
- Kluge, M., Schuld, A., Schacht, A., Himmerich, H., Dalal, MA., Wehmeier, PM., Hinze-Selch, D., Kraus, T., Dittmann, RW., & Pollmächer, T. (2009). Effects of clozapine and olanzapine on cytokine systems are closely linked to weight gain and drug-induced fever. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 118 - 128. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.08.016>
- Wong, J., & Delva, N. (2007). Clozapine-induced seizures: recognition and treatment. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 52, 457 - 463. <https://doi.org/10.1177/070674370705200708>

- Hiemke, C., Bergemann, N., Clement, HW., Conca, A., Deckert, J., Domschke, K., Eckermann, G., Egberts, K., Gerlach, M., Greiner, C., Gründer, G., Haen, E., Havemann-Reinecke, E., Hefner, G., Helmer, R., Janssen, G., Jaquenoud, E., Laux, G., Messer, T., Mössner, R., Müller, MJ., Paulzen, M., Pfuhlmann, B., Riederer, P., Saria, A., Schoppek, B., Schoretsanitis, G., Schwarz, M., Gracia, MS., Stegmann, B., Steimer, W., Stingl, JC., Uhr, M., Ulrich, S., Unterecker, S., Waschgl, R., Zernig, G., Zurek, G., & Baumann, P. (2018). Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry*, 51, 9-62. <https://doi.org/10.1055/s-0043-116492>
- Bertilsson, L., Carrillo, JA., Dahl, ML., Llerena, A., Alm, C., Bondesson, U., Lindström, L., Rodríguez de la Rubia, I., Ramos, S., & Benite, J. (1994). Clozapine disposition covaries with CYP1A2 activity determined by a caffeine test. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 38, 471-473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1994.tb04385.x>
- Eiermann, B., Engel, G., Johansson, I., Zanger, UM., & Bertilsson, L. (1997). The involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in the metabolism of clozapine. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 44, 439-446. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1997.t01-1-00605.x>
- Olesen, OV., & Linnet, K. (2001). Contributions of five human cytochrome P450 isoforms to the N-demethylation of clozapine in vitro at low and high concentrations. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 41, 823-832. <https://doi.org/10.1177/00912700122010717>
- Akamine, Y., Sugawara-Kikuchi, Y., Uno, T., Shimizu, T., & Miura, M. (2017). Quantification of the steady-state plasma concentrations of clozapine and N-desmethylclozapine in Japanese patients with schizophrenia using a novel HPLC method and the effects of CYPs and ABC transporters polymorphisms. *Annals of Clinical Biochemistry*, 54, 677-685. <https://doi.org/10.1177/0004563216686377>
- Kikuchi, YS., Kanbayashi, T., & Shimizu, T. (2018). Relationship between clozapine-induced electroencephalogram abnormalities and serum concentration of clozapine in Japanese patients with treatment-resistant schizophrenia. *Psychiatry Investigation*, 16, 279 - 284. <https://doi.org/10.30773/pi.2018.12.16>
- Ishii, H., Shimada, M., Yamaguchi, H., & Mano, N. (2016). A simultaneous determination method for 5-fluorouracil and its metabolites in human plasma with linear range adjusted by in-source collision-induced dissociation using hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 30, 1882-1886. <https://doi.org/10.1002/bmc.3743>
- Ishii, H., Yamaguchi, H., & Mano, N. (2016). Shifting the linear range in electrospray ionization by in-source collision-induced dissociation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 64, 356 - 359. <https://doi.org/10.1248/cpb.c15-00741>
- Ishii, H., Yamaguchi, H., & Mano, N. (2017). Expanding the versatility of a quantitative determination range adjustment technique using in-source CID in LC/MS/MS. *Chromatography*, 38, 59 - 63. <https://doi.org/10.15583/jpchrom.2017.004>
- Maekawa, M., Tsukamoto, T., Takasaki, S., Kikuchi, M., Sato, Y., Ogura, J., Hayakawa, Y., Yamaguchi, H., & Mano, N. (2019). Fundamental study of behaviors of in-source collision induced dissociation and shifting the linear range of calibration curves of various drugs and the metabolites used for therapeutic drug monitoring. *Chromatography*, 40, 71-78. <https://doi.org/10.15583/jpchrom.2019.009>
- Takasaki, S., Tanaka, M., Kikuchi, M., Maekawa, M., Kawasaki, Y., Ito, A., Arai, Y., Yamaguchi, H., & Mano, N. (2017). Simultaneous analysis of oral anticancer drugs for renal cell carcinoma in human plasma using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 32, e4184. <https://doi.org/10.1002/bmc.4184>
- Sato T., Suzuka M., Sato Y., Iwabuchi R., Kobayashi D., Ogura J., Takasaki S., Yokota M., Tsukamoto T., Hayakawa Y., Kikuchi M., Maekawa M., and Mano N. (2021). Development of a simultaneous analytical method for clozapine and its metabolites in human plasma using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry with linear range adjusting by in-source collision-induced dissociation. *Biomedical Chromatography*, 35, e5094. <https://doi.org/10.1002/bmc.5094>

LCMSおよびNexeraは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部 グローバルアプリケーション開発センター

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認を受けておりません。治療目的およびその手続き上での使用はできません。本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm> 閲覧には、会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録ください。<https://solutions.shimadzu.co.jp/>