

解熱鎮痛作用を持つOTC薬の
乳汁移行性の評価とメカニズムに関する研究

北海道大学 大学院薬学研究院

ふるげん あやこ
古堅 彩子

解熱鎮痛作用を持つ OTC 薬の 乳汁移行性の評価とメカニズムに関する研究

北海道大学 大学院薬学研究院 古堅 彩子

(共同研究者：小林 正紀、西村 あや子)

(〒 060-0812 札幌市北区北 12 条西 6 丁目 電話番号：011-706-3235)

【要旨】

近年、授乳の有益性に関する多くのエビデンスが積み重ねられ、母乳育児は世界的に推奨されている。しかしながら、薬剤服用中の授乳については、その安全性に関するエビデンスが十分でない場合もある。解熱鎮痛薬は一般用医薬品 (OTC) としても使用され、授乳期に必要性が高い薬剤の一つである。本研究は、解熱鎮痛薬の乳汁移行性を明らかにすることで、授乳期における安全性に関する情報を構築することを目的とした。

本研究では、授乳期に使用される可能性があり、安全性に関するヒトデータが十分ではない解熱鎮痛薬として Diclofenac に着目した。また、授乳の安全性を示すデータが十分報告されている Acetaminophen を比較対照とした。この 2 種類の化合物について、血漿および乳汁中における liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) 定量法を構築した。サンプルの前処理は、アセトニトリルを用いた除タンパクにより行った。分析カラムは Inertsustain phenyl-hexyl column (2.0 mm × 150 mm, 3 μm, GL Sciences) を使用し、10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (0.1% 酢酸) およびメタノール (0.1% 酢酸) の混液によるグラジエント溶出を行った。血漿および乳汁ともに、Acetaminophen に関しては 1-1000 ng/mL、Diclofenac に関しては 0.5-1000 ng/mL の濃度範囲で良好な直線性を示した。ジクロフェナクナトリウム錠を内服後のボランティア 2 名より得られた血漿および乳汁において、Diclofenac のピークが検出された。これらの結果から、今回構築した定量法は実検体へ適応できることが示された。

1、調査研究目的

母乳育児は、母児間の絆の形成だけでなく、母親と乳児の両方の健康に利点があるため推奨されている。したがって、医療従事者は、安心して母乳育児を実施する環境をサポートする

必要がある。しかしながら、薬剤服用中の授乳については、その安全性に関するエビデンスが十分でない場合もある。

解熱鎮痛薬は、授乳期に必要な性が高い薬剤の一つであり、セルフメディケーション推進の観点からも、乳汁移行性に関するデータの構築は重要である。また、分娩直後は出産に伴う疼痛に対して解熱鎮痛剤を使用することが多い。しかし、薬剤によっては乳汁移行性に関する疫学データが殆どない、もしくは測定感度の問題から適切に判断できないものもある。また、少人数の症例報告の場合が多く、日本人のデータは少ないという問題点も残されている。

本研究では、授乳期に使用される可能性があり、安全性に関するデータが十分ではない解熱鎮痛薬として Diclofenac に着目した。一方、Acetaminophen や ibuprofen に関しては、安全性を示す十分なデータが報告されている [1]。そこで、本邦においても幅広く使用されている Acetaminophen を比較対照として選択し、これら 2 薬剤の乳汁移行性について評価することとした。

薬剤の乳汁移行性ならびに授乳の可否を判断するにあたり、それぞれ Milk/Plasma (M/P) 比や Relative Infant Dose (RID) が参考となる。これらのパラメータの算出のためには、血漿及び乳汁中における高感度な定量系の確立が必要となる。近年、選択性および感度高く複数の化合物を一斉分析できる liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) が有力なツールとなっており、本研究においても採用した。解熱鎮痛薬の LC/MS/MS による定量法に関しては、これまでに、血漿や尿中マトリックスにおける定量法が構築されている [2-7]。しかしながら、乳汁中における定量法に関する報告はない。

本研究では、解熱鎮痛薬の LC/MS/MS による高感度定量法を構築し、各薬剤のヒト乳汁移行を明らかにすることで、授乳期における安全性に関するエビデンスを構築することを目的に検討を行った。

2、調査研究方法

2-1 試薬

Acetaminophen, Diclofenac sodium salt および内標準物質 (IS) として使用した重水素化体 (Acetaminophen-d4, Diclofenac-d4) は Cayman Chemical より購入した。HPLC グレードのメタノール、アセトニトリルおよび酢酸は Wako より、HPLC グレードの酢酸アンモニウム溶液はナカライテスクから購入した。

2-2 標準溶液

Acetaminophen および Diclofenac sodium salt を含む標準溶液はメタノール溶液として調製し、100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で保管した。Acetaminophen-d4 および Diclofenac-d4 を含む IS 溶液は、メタノール溶液として 1 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で調製した。全ての標準溶液は -80°C で保管した。

2-3 ヒト血漿および乳汁

ヒトブランク血漿は、Cosmo Bioより購入した。また、ヒトブランク乳汁はLEE Biosolutionより購入したもの、もしくは健康なボランティアより提供された乳汁を使用した。また、分娩後よりジクロフェナクナトリウム錠を内服している授乳婦より、血漿と乳汁を回収した。なお、本研究は、北海道大学病院 自主臨床倫理審査委員会の承認を得て実施した。

2-4 使用機器

HPLCによる分析物の分離には、Prominence 20A (Shimadzu)を使用した。分析カラムはInertsustain phenyl-hexyl column (2.0 mm × 150 mm, 3 μm, GL Sciences)を使用し、10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (0.1% 酢酸) およびメタノール (0.1% 酢酸) の混液によるグラジエント溶出を行った (Table 1)。カラム温度は40°Cに設定した。

質量分析にはトリプル四重極型質量分析計であるAPI 3200TM LC/MS/MS System (Applied Biosystems)を使用し、ESI positiveモード multiple reaction monitoring (MRM)により測定を行った。MRMにおけるモニタリングイオンおよび分析部の各種パラメータをTable 2示した。また、イオンソースにおける各種パラメータを以下の通り設定した: Source temperature, 650°C; spray voltage, 5500 V; curtain gas, 55 psi; ion source gas 1, 50 psi, ion source gas 2 of 80 psi, collision gas, 8 arbitrary units.

データは、Analyst software (version 1.5) (Applied Biosystems)により解析した。

2-5 サンプル前処理法

200 μLの血漿もしくは乳汁サンプルに、IS溶液 (1 μg/mL)を10 μL加えて混和した。800 μLのアセトニトリルを加えボルテックスした後、13,000 × g, 10 min, 4°Cにて遠心した。上清を回収し、窒素気流下で溶媒を留去した。残渣を100 μLの10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 / メタノール混液 (85:15, v/v)で溶解し、DISMIC-13HP filter (0.2 mm, ADVANTEC)に通した。サンプルをオートサンプラー用バイアルに移した後、10 μLをLC/MS/MSへインジェクトした。

3、調査研究成果および考察

3-1 LC/MS/MSによる定量条件の設定

はじめに、測定対象物のMRM条件を検討した。両化合物ともに、ESI positiveモードおよびnegativeモードにおける検出が可能であった。Negativeモードにおける検出感度は、positiveモードと比較して有利であった。しかしながら、negativeモードにおける測定では夾雑ピークが多々存在し、分析対象との分離も困難であったことから、positiveモードを選択した。Acetaminophen、Diclofenac および ISとして用いた重水素化体 (Acetaminophen-d4,

Diclofenac -d4) の標準品を用いて ESI positive モードにおけるマススペクトルを確認した。いずれもプロトン化したと考えられる基準ピークが確認された (data not shown)。続いて、それぞれの基準ピークをプレカーサーイオンに設定し、プロダクトイオンマススペクトルを確認し、強い強度を示したプロダクトイオンをモニタリングイオンとして選択した。Table 2 に選択したモニタリングイオンおよび標準品のインフュージョンにより設定した分析部パラメータを示した。なお、検出における偽陽性を判別する目的で、qualifier イオンも設定した。

続いて、クロマトグラフィーによる分離条件について検討した。Acetaminophen や Diclofenac の定量において、C18 カラム、フェニルカラム、さらには HILIC や多孔性グラファイトカーボンカラム等、様々なタイプの分析カラムの使用が報告されている [2-7]。そこで、予備検討において、C18 カラムとして Inertsustain C18 column (2.0 mm × 150 mm, 3 μm, GL Sciences)、フェニルタイプカラムとして Inertsustain phenyl-hexyl column (2.0 mm × 150 mm, 3 μm, GL Sciences)、HILIC カラムとして PC HILIC (2.0 mm × 150 mm, 3 μm, Shiseido)、多孔性グラファイトカーボンカラムとして HYPER CARB (2.1 mm × 100 mm, 3 μm, Thermo Scientific) を試した。PC HILIC では、Acetaminophen のピーク形状に問題があること、水系の移動相の割合が適当な条件において分離が達成されなかったことから候補から除外した。また、HYPER CARB では、Diclofenac の保持が極めて強かったため、候補から除外した。一方、Inertsustain C18 および Inertsustain phenyl-hexyl では、どちらのカラムにおいても Acetaminophen と Diclofenac の適切な分離と良好なピーク形状が得られた。最終的に、分離度がより良好であった Inertsustain phenyl-hexyl column (2.0 mm × 150 mm, 3 μm, GL Sciences) を選択した。

移動相としては、有機溶媒 (メタノール、アセトニトリル) および緩衝液 (10 mM 酢酸アンモニウム、10 mM 酢酸アンモニウム + 0.1 % 酢酸) の組み合わせを検討した。Positive モードにおける感度は、メタノールがアセトニトリルに比べて優れていた。また、positive モードにおける化合物のプロトン化を促進する目的で 0.1% の酢酸を加えることとした。最終的に、10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (0.1% 酢酸) およびメタノール (0.1% 酢酸) のグラジエント溶出により分離した (Fig. 1)。測定時間は、カラムの平衡化時間を含めて 13 分であった。

3-2 前処理条件の設定

前処理は有機溶媒を用いた除タンパク法により行った。有機溶媒として、アセトニトリルおよびメタノールを検討した。血漿サンプル中における分析対象の検出については、メタノールおよびアセトニトリルの使用で大きな違いは観察されなかった。一方、前処理溶媒としてのメタノールの使用は、乳汁サンプル中の Acetaminophen および Acetaminophen-d4 の検出において、定量に影響を及ぼす夾雑ピークが観察された。したがって、前処理には、アセトニトリルを使用することとした。また、除タンパク後に上清を回収し、窒素気流下で溶媒を留去することで感度の向上を試みた。最終的に、200 μL の血漿および乳汁を用いた。

3-3 検量線

Acetaminophen および Diclofenac の添加濃度と Area 比 (各測定対象の Area/IS の Area) から線形最小二乗法により $1/X$ の重み付け回帰した。血漿および乳汁ともに、Acetaminophen に関しては 1-1000 ng/mL、Diclofenac に関しては 0.5-1000 ng/mL の濃度範囲で良好な直線性を示した ($r^2 > 0.99$) (Fig. 2)。

3-4 構築した定量法の実検体への適用

構築した定量法を用いて、実検体における適応が可能か検証した。ジクロフェナクナトリウム錠を内服後の授乳婦ボランティア 2 名より得られた検体において、検証を行った。その結果、血漿および乳汁どちらにおいても Diclofenac のピークが検出された (Fig. 3)。これらの結果から、今回構築した定量法の実検体への応用が示された。また、Diclofenac は乳汁中でも検出されたことから、ある程度乳汁へ移行しているものと予測される。しかし、乳汁可否の判断においては、単に乳汁並行されるか否かという情報ではなく、乳児の摂取量の割合を示す Relative Infant Dose (RID) による評価が重要となる。一般的に、RID < 10% では、授乳との両立が可能と考えられている。これまでに、Diclofenac の M/P 比および RID に関する報告はない。今後、実検体における解析を進め、M/P 比および RID を算出して評価を行うことが必要である。

4、まとめ

本研究では、解熱鎮痛薬の乳汁移行性および授乳の可否に関する知見を得ることを目的として、ヒト血漿および乳汁中における Acetaminophen および Diclofenac の LC/MS/MS 定量法を構築した。現在、構築した定量法を用いて、実検体における定量データを収集するとともに乳汁移行性に寄与する因子の解析を進めている。さらに、今後、基礎実験において乳汁移行のメカニズムを併せて検討することで、より安全な授乳期のセルフメディケーションに向けた研究を展開していく予定である。

5、謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました一般用医薬品セルフメディケーション振興財団ならびに関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

6、引用文献

- [1] Medications and Mothers' Milk 2017
- [2] An JH, Lee HJ, Jung BH. Quantitative analysis of acetaminophen and its six metabolites in rat plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 26:1596-1604 (2012).
- [3] Cook SF, King AD, van den Anker JN, Wilkins DG. Simultaneous quantification of acetaminophen and five acetaminophen metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: Method validation and application to a neonatal pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1007:30-42 (2015).
- [4] Alam MA, Al-Jenoobi FI, Al-Mohizea AM. High-throughput ultra-performance LC-MS-MS method for analysis of diclofenac sodium in rabbit plasma. *J Chromatogr Sci.* 53:47-53 (2015).
- [5] Nemoto T, Lee XP, Kumazawa T, Hasegawa C, Fujishiro M, Marumo A, Shouji Y, Inagaki K, Sato K. High-throughput determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human plasma by HILIC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 88:71-80 (2014).
- [6] Lu W, Zhao S, Gong M, Sun L, Ding L. Simultaneous determination of acetaminophen and oxycodone in human plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *J Pharm Anal.* 8:160-167 (2018).
- [7] Dierkes G, Weiss T, Modick H, Käfferlein HU, Brüning T, Koch HM. N-Acetyl-4-aminophenol (paracetamol), N-acetyl-2-aminophenol and acetanilide in urine samples from the general population, individuals exposed to aniline and paracetamol users. *Int J Hyg Environ Health.* 217:592-599 (2014).

表および図

Table 1 グラジエント条件

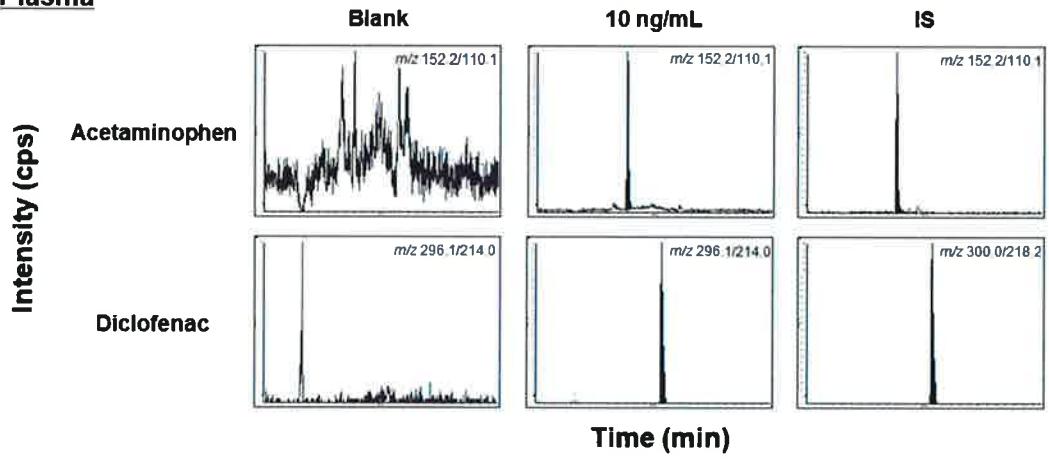
Time (min)	% solvent A	% solvent B	
0.0	85	15	
2.0	10	90	
7.0	10	90	
8.0	85	15	A: 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (0.1% 酢酸)
13.0	85	15	B: メタノール (0.1% 酢酸)

Table 2 MRM におけるモニタリングイオンおよびパラメータ

Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Dwell time (msec)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CEP (V)	CXP (V)
Acetaminophen	152.2	110.1	300	36	5.5	21	10	4
Acetaminophen qualifier	152.2	65.1	50	36	5.5	39	10	4
Diclofenac	296.1	214.0	300	21	6	43	14	4
Diclofenac qualifier	296.1	250.1	50	21	6	15	14	6
Acetaminophen-d ₄ (IS)	156.2	114.0	150	36	5.5	21	10	4
Diclofenac-d ₄ (IS)	300.0	218.2	150	21	6	43	14	4

Fig. 1

Plasma



Breastmilk

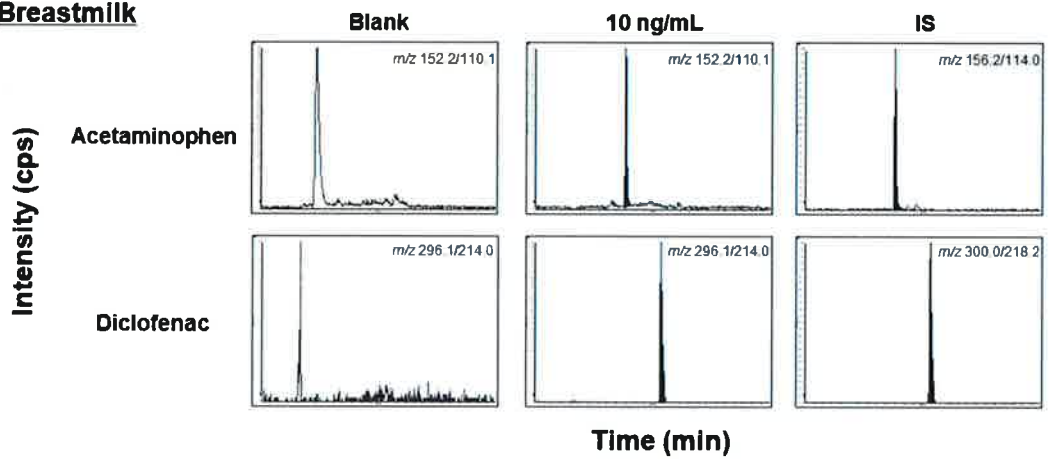


Fig. 1 Acetaminophen および Diclofenac 定量法におけるクロマトグラム (Blank, 10 ng/mL, および IS:内標準物質)

Fig. 2

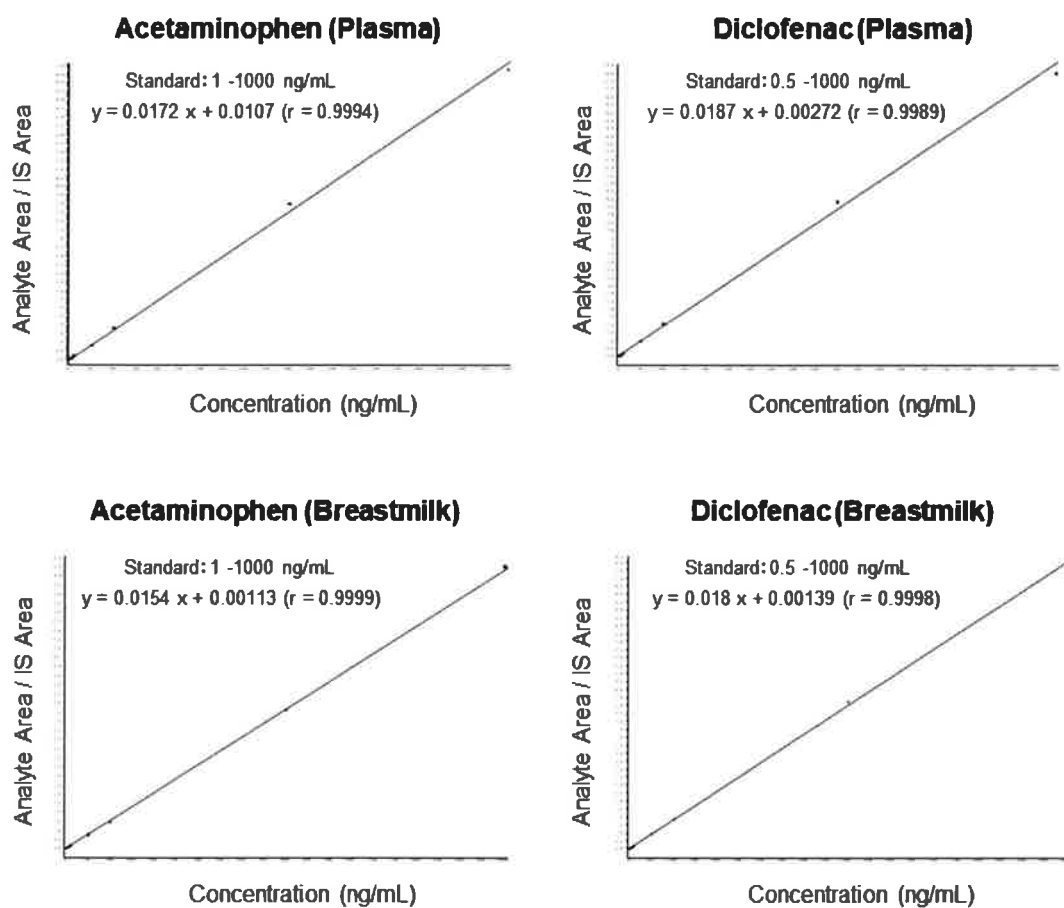


Fig. 2 Acetaminophen および Diclofenac の血漿および乳汁中定量法における検量線

Fig. 3

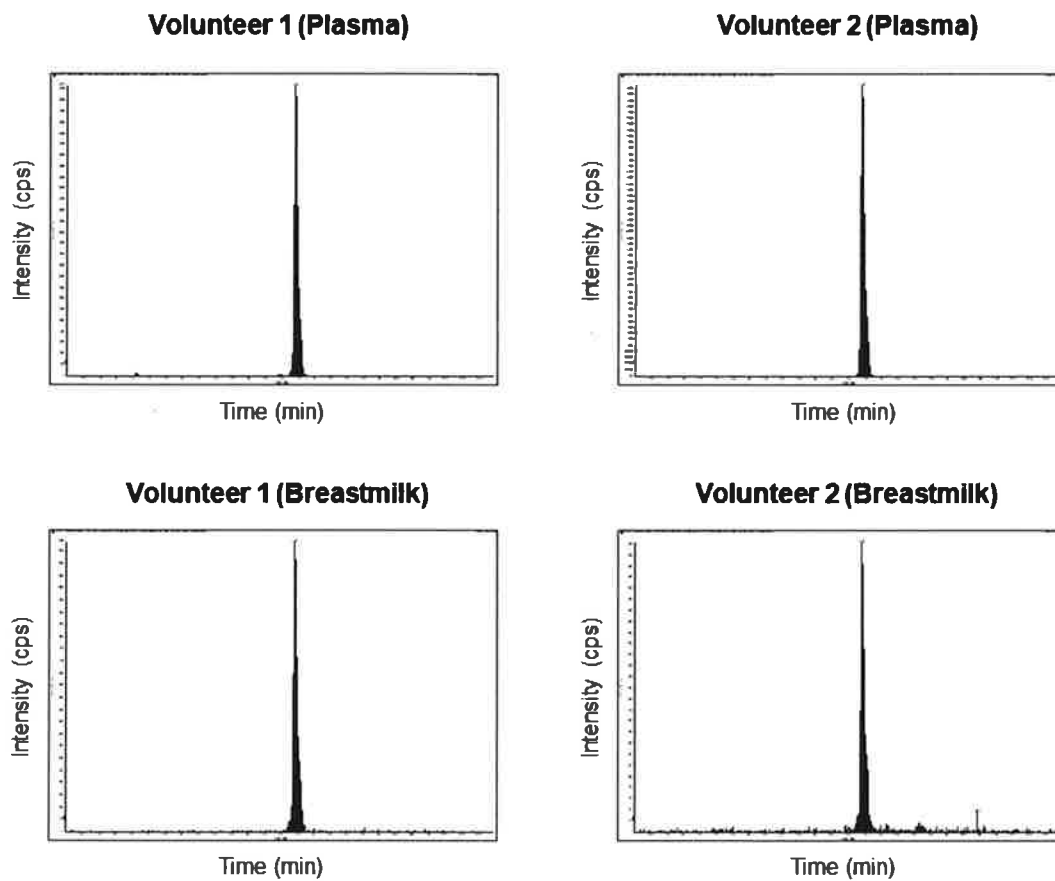


Fig. 3 ジクロフェナクナトリム錠内服後の血漿および乳汁検体におけるクロマトグラム