

UNIFI を用いた WinNonlin の活用： データのエクスポート機能を強化した 代謝物構造推定アプリケーションソリューション

Yun Alelyunas, Paul Rainville, and Mark Wrona; Waters Corporation

目的

UNIFI® 科学情報システムを用いて測定および解析されたマイクロソーム代謝試験を例に、WinNonlin を使用したクリアランス PK 値算出までのシンプルなワークフローについてご紹介します。

背景

LC/MS データの取得は、薬物動態 (DMPK) 分野に不可欠なものです。得られたデータをいかに判断材料となる情報に変えるかということは非常に重要ですが、一般的に様々なソフトウェアツールの使用が必要となり、律速となる場合があります。そのため、取得したデータを正確かつ容易にさまざまなサードパーティーのソフトウェアパッケージへの移管を可能とする LC/MS ソフトウェアが必要です。その機能は、薬物の探索や開発の鍵となる情報を抽出および取得するために重要です。

一例として、Phoenix WinNonlin (Certara, St. Louis, MO, U.S.) のような業界標準のソフトウェアパッケージを使用して LC/MS データから薬物動態パラメーターを計算することがあります。PK パラメーターの計算は、通常ある候補薬物群に対して開発継続の可能性を判断するために行われ、優先順位付けをするのに役立ちます。機器のソフトウェアとサードパーティーのソフトウェアプラットフォーム (WinNonlin、Spotfire など) 間での電子的およびカスタマイズ可能なデータの移管 / 統合は望ましいアプローチであり、正確さとスピードの両方を備えつつ大量データの取り扱いや処理を行うために極めて重要です。

UNIFI は、様々なサードパーティー薬物動態解析ソフトのフォーマットに合わせてカスタマイズ可能であり、完全なデータ移管をサポートします。
表のエクスポート機能が強化され、マイクロソフトのエクセルフォーマットに対応した様々な計算や統計ソフトウェアパッケージとの連携をサポートします。

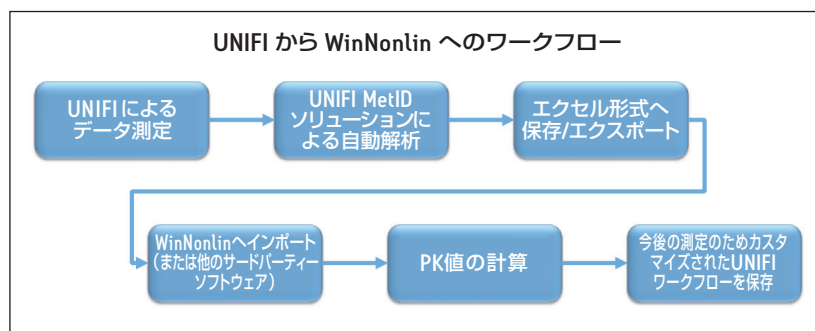


図 1. UNIFI と WinNonlin ソフトウェアを用いたワークフロー

下記機能を備えた UNIFI ソフトウェアの使用によりデータのエクスポート機能を強化：

- 表形式データの直接エクスポート (総合的なエクセル .xls のサポートおよび標準的なスペクトル .mzml フォーマットをサポート)。
- 完全カスタマイズ。UNIFI の表は、エクスポートにおいてユーザーがまさに必要とする形式に構成し保存することが可能。エクスポート機能は、次のような特定の情報を含めることも可能：
 - 特定の縦列や列の順番 (レスポンス、レスポンス比、時間、種、処理、被験者 ID など)
 - カスタム縦列 (ユーザーがカスタマイズ可能な値)
 - サマリーやカスタム計算 (最大、最小、平均値などの算出を UNIFI の計算機能でサポート)

- 処理された全データセットまたはフィルターを掛けた部分データ (QC、未知試料などの個別の表など)
- フィルターの基準をユーザーが定義。エクスポートする列の定義付けやカスタマイズの柔軟性 (例：ヒトにおける特定の投与量もしくは時点でのデータをフィルター処理)

エクスポートされたデータは、マニュアルコピーや転写することなくサードパーティーのパッケージに持ち込むことができ、カスタマイズした表レイアウトは、UNIFI に保存可能です。これら機能の全てが誤りを最小限にし、多数のデータセット解析を容易にします。ここでは、Xevo® G2-S QToF で測定した UNIFI データから WinNonlin を用いてマイクロソームにおけるクリアランスを計算するまでの手法をステップ毎にご紹介します。

ソリューション

タンパク濃度 1 mg/mL のヒト肝マイクロソームを使用してクロザピンの代謝試験を行いました。代謝反応は、経時変化の検討をするため 2 時間モニターしました (15 分間隔で一定量回収)。UNIFI の装置コントロール下にある ACQUITY UPLC® I-Class システムと Xevo G2-S QToF 質量分析計を用いて、サンプルの測定と解析を行いました。

図 2 は、未変化体薬物のクロザピンが、2 時間の経時変化において消失していくプロファイルを UNIFI 上で表示したものです。クリアランス計算のため UNIFI からデータをエクスポートし、WinNonlin (version 6.3) へインポートしました。下記のステップでは、その一連の流れを説明します。

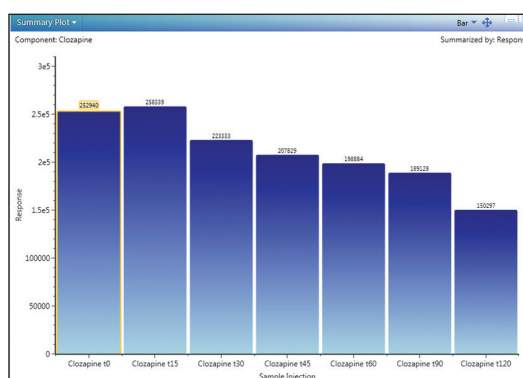


図 2. クロザピン濃度の経時変化プロファイル (トレンドプロット)

ステップ 1: エクスポートのための UNIFI データのカスタマイズ

高分解能質量分析計 (HRMS) のデータは、定性と定量の両情報が含まれています。クリアランスの計算には、未変化体化合物の情報のみが必要となります。エクスポートに必要な情報を表に配列させ、フィルターを掛け、展開させます (図 3 参照)。もしエクスポートにおいて、縦列の追加もしくは削除が必要とされる場合には、タイトル行の上で右クリックし、列の追加 (または削除) を選択することで変更されます。列の追加 / 削除画面には、表中でユーザーが変更可能な欄が表示されます (図示なし)。

タイトル行を右クリックし
列を追加

矢印ボタンをクリックして
化合物をスクロール

サンプルごとに
化合物データを表示

Item name	Component name	Observed RT (min)	Time (min)	Response	Formula	m/z	Description	Label	Mass error (mDa)	Mass error (ppm)	Percentage of Parent Response (%)	Sample position	Adducts	Identification status
1	Clozapine 10	Clozapine	2.44	0.00	252940	C18H19CN4	327.1369		-0.2	-0.64	100.000	1A.1	+H, 2x(+H)	Identified
2	Clozapine 115	Clozapine	2.44	15.00	258339	C18H19CN4	327.1365		-0.6	-1.89	100.000	1B.1	+H, 2x(+H)	Identified
3	Clozapine 130	Clozapine	2.44	30.00	223333	C18H19CN4	327.1369		-0.2	-0.74	100.000	1C.1	+H, 2x(+H)	Identified
4	Clozapine 145	Clozapine	2.44	45.00	207829	C18H19CN4	327.1367		-0.4	-1.34	100.000	1D.1	+H, 2x(+H)	Identified
5	Clozapine 160	Clozapine	2.44	60.00	198884	C18H19CN4	327.1368		-0.3	-0.94	100.000	1E.1	+H, 2x(+H)	Identified
6	Clozapine 180	Clozapine	2.44	90.00	189128	C18H19CN4	327.1366		-0.5	-1.48	100.000	1F.1	+H, 2x(+H)	Identified
7	Clozapine 1120	Clozapine	2.44	120.00	150297	C18H19CN4	327.1371		0.0	0.00	100.000	1A.2	+H, 2x(+H)	Identified

図 3. クロザピン濃度の経時変化を示す成分サマリーデータ (表示データは、同定ステータス=同定、関連したものは関連情報のみを表示しないというフィルターが掛けられている)

ステップ 2: UNIFIデータのエクスポート

成分サマリーテーブルに表示されているデータは、右端上部にあるファイル>フィルター済み結果のエクスポートを選択し、エクスポートします（図示なし）。エクスポートオプションと呼ばれるダイアログボックスが表示されます（図 4）。ファイル形式にマイクロソフトのエクセルを選択し、ファイル名と保存先フォルダーを入力します。必要に応じて、データをコピー（UNIFI の表上で右クリックし、ドロップダウンメニューのコピーを選択）でエクスポートし、直接エクセルのような機能を持つ他のソフトウェアパッケージにペーストすることも可能です。

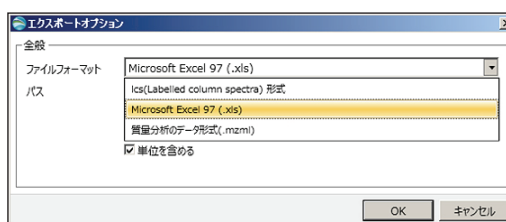


図 4. ファイルからフィルター済み結果のエクスポートを選択後、表示されるエクスポートオプション画面

ステップ 3: WinNonlinを用いたクリアランス値の計算

クリアランス評価のためのシンプルなワークフローを示します。

- ステップ 3A: WinNonlin にデータをインポート、ステップ 2 で保存された .xls ファイルを使ってインポートします。
- ステップ 3B: 図 5 で示される WinNonlin のデータウィザードを使用して、一次速度の計算をするためレスポンスを Ln（レスポンス）に変換します。

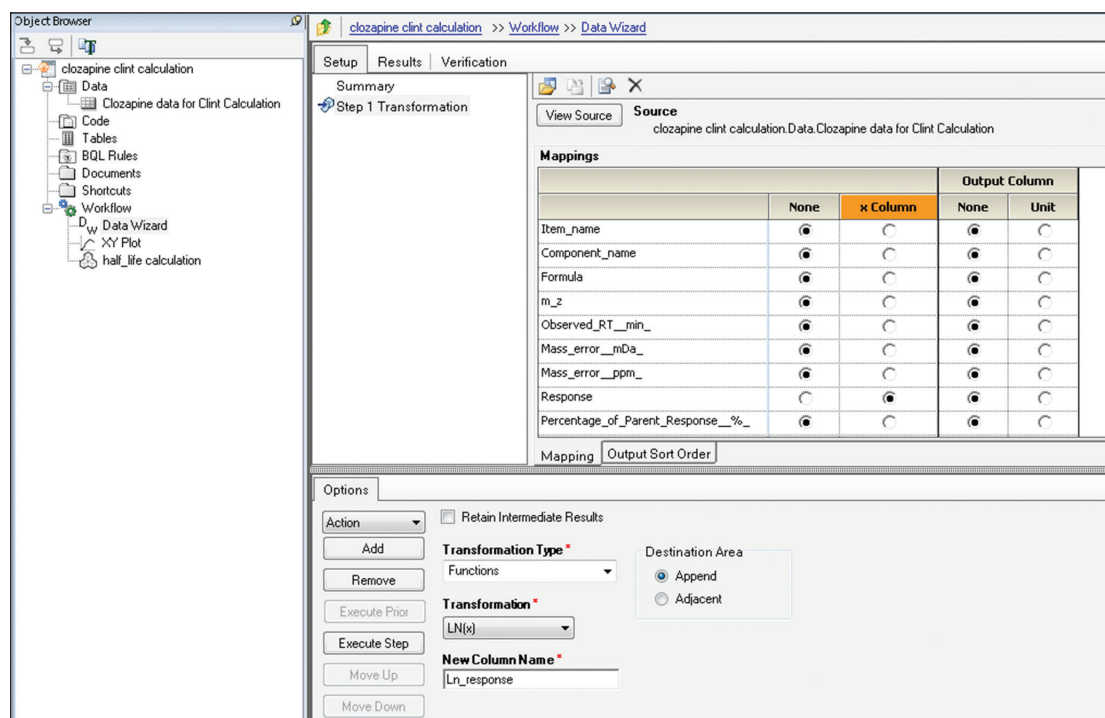


図 5. レスポンスを Ln（レスポンス）に変換するための WinNonlin データウィザード画面

- ステップ 3C：WinNonlin のデータウィザードから XY プロットを生成します (図 6)。ユーザーが、最初に見るデータのプロットです。直線の回帰線もプロットに追加されます。

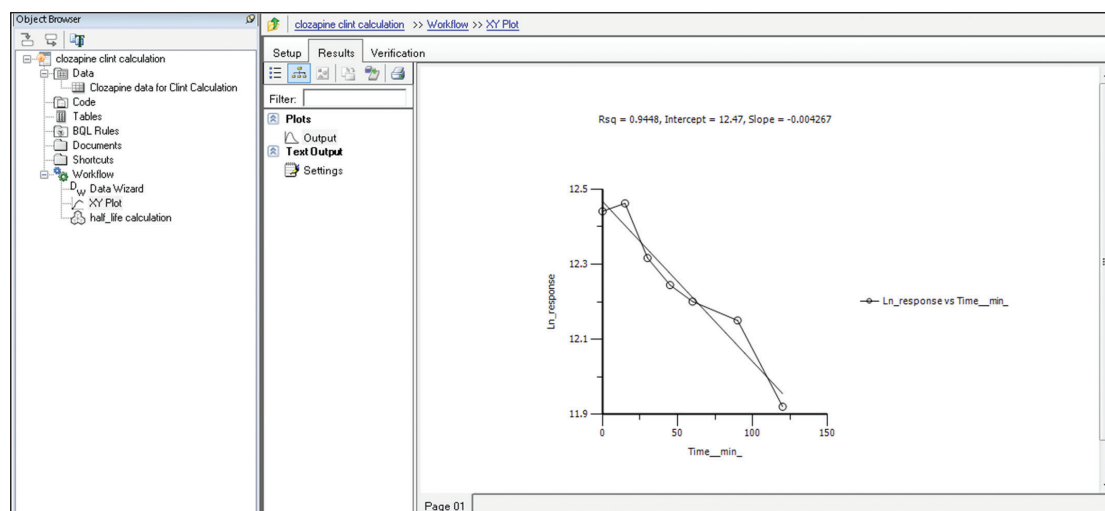


図 6. \ln (レスポンス) に対する反応時間のプロットが表示されている WinNonlin XY プロット画面

- ステップ 3D：最後のステップは、クリアランスや $t_{1/2}$ 値を得るために一次速度の計算を行います。Phoenix モデルセットアップ画面を、図 7 と図 8 に示します。計算から $t_{1/2}$ は 162 ± 15 min、 Cl_{int} 値は 4.3 ± 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ と算出されました。クリアランス値は、論文でレポートされた値 6.2^1 および 5.02^2 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ に近い値として計算されました。

The figure shows the WinNonlin Phoenix Model Setup screen. The left pane displays the 'Object Browser' with a tree structure including 'clozapine Clint calculation', 'Data', 'Tables', 'BQL Rules', 'Documents', 'Shortcuts', 'Workflow', 'Data Wizard', 'XY Plot', and 'half-life calculation'. The main window has tabs for 'Setup', 'Results', and 'Verification'. The 'Setup' tab is active, showing the 'Main (Data Wizard Result)' tab. The 'Source' is mapped to 'clozapine Clint calculation.Workflow.Data Wizard.Result'. The 'Mappings' table is shown below:

Item_name	None	Sort	C	EObs
Component_name	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Formula	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
m_z	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Observed_RT_min_	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Mass_error_mDa_	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Mass_error_ppm_	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Response	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Percentage_of_Parent_Response_%_	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sample_position	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Adducts	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Identification_status	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Replicate_number	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Time_min_	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
Derived	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Ln_response	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>

The 'Mapping' tab is selected. The 'Output Sort Order' is set to 'no warnings'. The 'Population?' checkbox is checked. The 'Structure' tab is active, showing the 'Type' as 'Linear'. The 'Linear' model is defined by the equation $E = \text{Alpha} + \text{Beta} * C$. The 'Parameters' section shows 'Alpha' and 'Beta' as covariates. The 'Statements' section shows the equation $E = \text{Alpha} + \text{Beta} * C$ and the error term $\text{error}(Eps = 1)$. The 'Sidev' section shows the value 0.0404073 and the 'Accept' button.

図 7. 時間に対する濃度の線形における WinNonlin Phoenix モデルのセットアップ

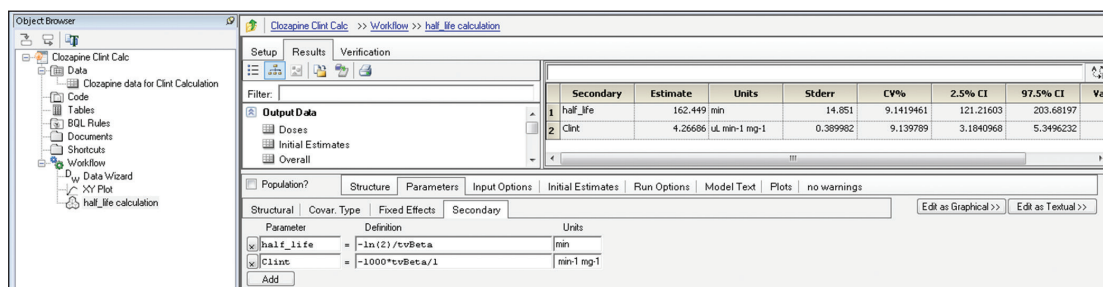


図 8. データの線形モデルから計算されたクリアランス、 $t_{1/2}$ 、関連する統計値

最終的に上記のステップは、図 9 のワークフローのように WinNonlin で保存されます。ワークフローは、テンプレートとして保存され、今後のデータセットに適用されます。

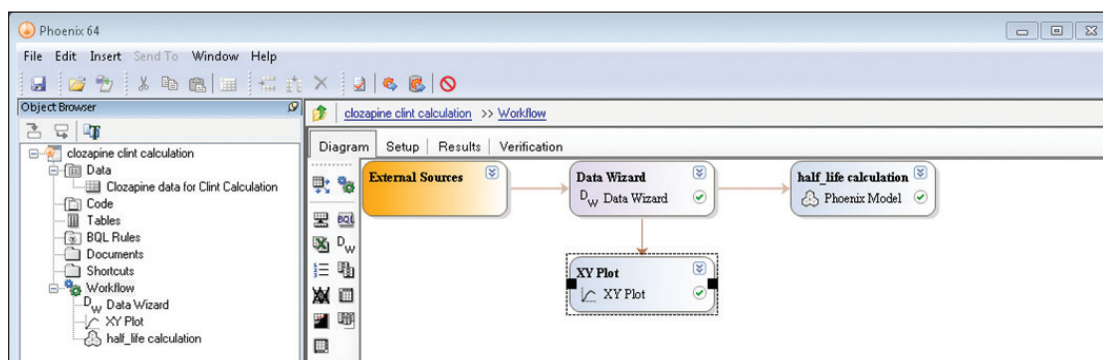


図 9. クロザピンのクリアランス計算における WinNonlin ワークフロー

まとめ

ソフトウェアパッケージ間でのデータの移動は、障壁となりうるものです。また手作業では間違いも起こりやすくなります。このテクノロジーブリーフでは、UNIFI ソフトウェアで測定し自動解析されたデータが、サードパーティーのソフトウェアソリューションでの計算のために容易にエクスポートでき、DMPK 分野においてシンプルでパワフルさも兼ね備えたソリューションをもたらすことをご紹介しています。UNIFI と WinNonlin のワークフローを組み合わせることで、ユーザーは、UNIFI からの今後のデータセットの容易なインポートや処理に加えて、将来の分析に対するこれらデータ一覧の保存が可能となります。ここでは、ヒト肝ミクロソームを用いたクロザピンのクリアランス値推定に WinNonlin を使用した例をご紹介しました。

参考文献

1. Bonn B, Leandersson C, Fontaine F, Zamora I. Enhanced metabolite identification with MSE and a semi-automated software for structural elucidation, Rapid Comm. Mass. Spectr. 2010; 24: 3127–3138.
2. Obach R S, Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes, Drug Metab. Dispos. 1999;27:1350-9.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
 大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
 ショールーム 東京 大阪
 テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌 富山

Waters、ACQUITY UPLC、UPLC、Xevo、UNIFI および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2014 Waters Corporation. Printed in Japan. 2014年5月 720004947JA PDF