
総 説

福山大学薬学部研究年報
第3号 (1986)

臨床薬物モニタリング (TDM)

— その方法と問題点 —

今井日出夫, 桜 幸子, 玉井 元
(生物薬学科・薬品分析化学教室)

1. TDM の必要性

薬物の血中濃度を測定して患者の状態を客観的に把握し、効果的な投薬、治療を行うことを目的とする TDM (Therapeutic Drug Monitoring) は、臨床薬学の重要な一部門である。

メソトレキセート (MTX) は、今世紀半ば頃から代謝拮抗性抗がん剤の一つとして登場したが、数年前から1回に5~10g という大量投与を行い、24時間後から Ca-ロイコボリンによる救助 (Rescue) をかける方式が採用されてから、とくに白血病患者によく適用され、患者の85%にも及ぶ高い緩解率に大きく寄与している。しかし一方でその危険率も高く、H. Breithaupt¹⁾ の報告によると、本法の適用患者498名中その6%に当る29名が、薬がもとになって骨髓機能低下や腎毒性のため死亡したとされている。大量投与直後 MTX の血中濃度は数 mM にも達するが、通常 24 h 後で 10^{-2} mM 以下、48 h 後で 10^{-3} mM 以下、72 h 後で 10^{-4} mM 以下となる。しかしこの値まで減少しない患者は極めて危険な状態にあり、Ca-ロイコボリンによる救助が必要となる。TDM の重要性はこの例からよく理解されるであろう。

薬物の生体内利用性 (Bioavailability) という立場からする薬物送達系 (Drug Delivery System, DDS) の最近の発展は、本誌前号の菅家、吉富の総説²⁾ に詳しい。そこには、薬物による中毒を回避して有効に薬物を投与するという目的もあって、さまざまな剤形や投与方法の工夫が検討されているが、さりとて TDM が無用という段階は遙か将来のことであろう。

分析化学の最大の顧客は、医療に関係する分析にあると、アメリカでいわれている。全米で年間の医療関係分析件数は10億件、年々15~20%が増加しているといわれる。いろいろのデータから³⁾、その増加のかなりの部分が TDM に関わると考えられる。我国の大学病院の臨床検査件数は、一

病院年間150万件程度と考えられるが、この中には TDM は入っていない。長くエール大学病院で心疾患の治療に携ってきた知人が、広島大学病院に帰ってきて、ここで不整脈患者にキニジンを投与したくても、日本には TDM が一般化していないので困ると言っていた。我国では昭和56年頃から、リチウム、ジギタリス製剤、抗けいれん薬（抗てんかん薬）の幾つかについて診療報酬が規定されているが、一般の TDM については、若い医師が研究的に自ら試みるか、製薬業者に分析を依頼する以外に、取るべき方法がないというのが現状である。我国では TDM の実施は、今後の課題というべきであろう。

2. どんな薬物が TDM の対象となるか

Sadée の書物³⁾から、1978年1ヶ年間の UCSF（カリフォルニア大学サンフランシスコ校）での TDM のデータを拾ってみよう。表1に見られるように、分析件数の多い薬物は、ジゴキシン（強心配糖体）、テオフィリン（喘息薬、気管支拡張薬）、フェニトインなどの抗けいれん薬である。一般に TDM の対象となるのは、

1. リチウム、ジゴキシン、メソトレキセート、ゲンタマイシンのように、強い副作用をもつもの。

表1. UCSF における年間 TDM 件数
((1978), 文献3)による)

薬 物	年間件数	分 析 法
Acetoaminophen	22	HPLC
Carbamazepine	226	HPLC
Digoxin	1668	RIA
Ethosuximide	112	HPLC
Gentamicin	636	RIA, HPLC
Isoniazid	58	C
Lidocaine	31	GC
Lithium	452	AA
Methotrexate	262	PBA, HPLC
Phenobarbital	569	HPLC
Phenytoin	1411	HPLC
Primidone	48	HPLC
Procainamide	81	HPLC
Propranolol	40	HPLC
Quinidine	233	HPLC
Salicylate	250	C
Sulfonamide	9	C
Theophylline	1326	HPLC

(他に Anticonvulsants の計 669件)

2. ジゴキシン、テオフィリン、抗けいれん薬（フェニトイン、エトスクシミド、カルバマゼピン、フェノバルビタール、プリミドンなど）のように、治療濃度範囲が狭いもの。

3. テオフィリンのように、薬物代謝に個人差が著るしいもの。

である。そして、年齢とくに小児、及び病態とくに肝臓と腎臓の疾患の有無によって、TDMの必要性は異なる。又患者が用法指示を守っていない場合（non-complianceの問題）のチェックにTDMを行うこともあり、ときに指示以外の薬物の服用のチェック（たとえば痩せるために利尿薬をひそかに用いる）といった問題もある。

上述した例のうち、ゲンタマイシンは、毒性の少ないトブラマイシンに代りつつあり、フェニトインは、薬物速度論の検討から、TDMの意義が少いとされている。

3. どんな分析法が用いられるか。

TDMの分析法には、殆んど凡ゆる分析法が駆使されている^{3,4)}。

ガスクロマトグラフィー (GC), GC-マススペクトロメトリー (GC-MS), 薄層クロマトグラフィー (TLC, HPTLC), 高速液体クロマトグラフィー (HPLC), 紫外吸収 (UV), 蛍光 (F), 比色 (C), ポーラログラフィー (P), イオンクロマト (IC), ラジオイムノアッセイ (RIA), ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) や EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) を含むエンザイムイムノアッセイ (EIA), その他蛍光の偏光解消, レーザーネフロメトリー, スピンイムノアッセイなどのイムノアッセイ (IA), レセプターとの競合的蛋白結合による分析法 (PBA), 酵素による化学増幅作用を用いる分析法 (EA), 原子吸光法 (AA), プラズマ発光法 (ICP), 化学発光法 (CL), 電気化学発光法 (ECL), 光音響法 (PAS), 微生物学的方法 (MBA) と、その方法は枚挙に遑がないほどであるが、その選択は、第1に、

1. 簡便さが多数の検体処理に重要で、EAには1検体1分という方法もある。又、連続的に自動分析するシステムも多い。

2. 高感度性と選択性、とくにジゴキシンの血中治療濃度は $0.5 \sim 2 \text{ ng/ml}$ と低く、しかもこの種の化合物には、一般に高感度で特異性の高い簡便な分析法がない。そのため煩雑でも GC-MS, RIA などによる他ないのが現状である。

その他、分析データの再現性、サンプルが少量で済むこと、廃棄物処理が容易であることも、分析法選択に関わる重要な問題であるが、それにもまして、

3. メタボライトの同時分析が可能か否かが重要である場合が多い。

たとえば、初めに述べた MTX のメタボライトである 7-ヒドロキシ体や APA (2, 4-ジアミノ-N¹⁰-メチルプテロン酸) は、両者とも10%以下の寄与しかないというものの EA による分析

値を高める結果となる。これに対して、HPLC は、10～20分と分析所要時間が長い、メタボライトを含めてそれぞれを同時分析できるので有利である。昨今 HPLC が最も良く用いられる理由の一つはここにあるといつてよいであろう。

4. 分析法に関してどんな問題があるか。

TDM の検体として最もよく用いられるのは、体液わけでも血液で、(1)採取し易さ、(2)内因性成分組成の一定性、(3)中間的メタボライトも共存しているという点で、他の体液すなわち、尿、脳脊髄液、唾液などに優り、薬物動態の測定も屢々血中濃度の変化を指標としている。

血液を検体とするとき、先ず血球を分離して、血清又は血漿とする。このとき目的の薬物成分が血球膜に捉われ、どう挙動しているかについての詳細な検討は余りなされていない。最近免疫抑制剤として注目されているシクロスポリン A は、治療濃度 ($0.15\text{--}0.4\text{ }\mu\text{g/ml}$ 血漿) を越えるとき、腎、肝、中枢神経系に対する激しい毒性が問題で、TDM の対象とされるが⁵⁾、その血中分布は、赤血球 60%、その他の血球中 10%、血漿中 30%、血漿中の内訳はリポ蛋白中 21%、血漿蛋白中 7%、そして遊離型が 2% と報告されている⁶⁾。又、セロトニンについて、血小板の影響の他、血液試料の保存状態 (温度、パージリン等の MAO 抑制剤、溶存酸素による酸化など) の影響などを取扱った例⁷⁾ もあり、臨床分析の立場からする生体成分についての検討は多いが、薬物についての詳細な検討は今後の検討に俟つところが多い。

血球を分離して得られる血清又は血漿は、5—8% の蛋白質を含んでいる。血清と血漿とで、後者にはフィブリノーゲンが含まれる以外に、酵素蛋白量にも微妙な差があるが、それは別として、血中の蛋白質の存在は薬物分析に大きな影響を持っている。

それは、蛋白質が分析を妨害することがあるということに止らず、薬物成分は、殆んど例外なく蛋白質に結合しているからである。その結合率はインスリンの 1—10%、ゲンタマイシンやトブラマイシンの 10% という低い値から、スピロラクトンの 98%、クロフィブレードの 99% などという高い値まで広範囲に亘っており⁸⁾、ユビキノロンやトコフェロールなどのようにほぼ 100% とみなされるものもある。その結合には、双極子間の静電的な相互作用や、水素結合、あるいは疎水性相互作用などさまざまな要因が考えられる。ある種の薬物では、蛋白質に結合していない遊離型 (Free の頭文字をとり F で表わす。) の濃度と薬効との相互関連性が問題とされる場合もある。

さて、従来の分析法では、血清又は血漿試料から、薬物成分を溶媒抽出したり、吸着剤を使って濃縮捕集したり、あるいは変性沈殿剤で除蛋白するなどの前処理法が行われてきた。このとき、血清又は血漿試料に、抽出溶媒や吸着剤 (アルミナ、活性炭、あるいはアンバーライト XAD-2 のような共重合樹脂)、又は変性沈殿剤 [2—5% トリクロロ酢酸 (TCA), 0.2—0.4M 過塩素酸

(PCA), 50%メタノール (MeOH), 50%アセトニトリル (CH_3CN) など] が加わると, 蛋白質と結合している薬物はどう挙動するであろうか。抽出溶媒あるいは吸着剤表面と水相との間に, 一定の分配あるいは吸着平衡が成立っているだけでなく, 抽出溶媒や吸着剤は遊離型を介して, 蛋白質との間で, 薬物分子の奪い合いを演じていることになる。血中に含まれる血清蛋白質, リポ蛋白質のみならず遊離脂質などもこの取り合いに参加しているであろう。蛋白質の変性沈殿剤を加えたときも同様に, TCA や PCA の溶液は強酸性で, 塩基性薬物を蛋白質沈殿から奪って水相に移行させ, 反対に酸性薬物の解離を妨げて蛋白質沈殿に持ち込むことになる。又, TCA アニオンがアミンなどとイオン対を作って脂溶性を増すことの効果もありうる。MeOH や CH_3CN による変性沈殿の場合も同様に, 蛋白質との結合量は有機溶媒により大きく変わりうる。したがって, 表2の(A), (B), (C)に例を示すように, 実験で得られた回収率の意味は, 絶対的なものでなく, 諸種の物理的, 化学的要因によって変動し易いものと言わなければならない。このような場合, よく内部標準

表2 血液試料の前処理法による回収率の変動

A. セロトニンの n-ブタノールへの溶媒抽出による回収率 (未発表データ)

加えた対イオン	回収率, %
5% CF_3COO^-	59
5% CCl_3COO^-	68
1% SDS	97

B. 2, 3のインドール化合物のアンバーライト XAD-2 による吸着回収率⁷⁾

インドール化合物	回収率, %
トリプトファン	98
セロトニン	87
5-ヒドロキシインドール-3-酢酸	82
メラトニン	78

C. 除蛋白法による薬物の回収率の変化¹⁷⁾

血 中 薬 物	蛋白結合率, %	回 収 率, %		
		5% TCA	50% CH_3CN	蛋白質コート ODS
プロカインアミド	14-16	88.6	98.2	100.2
6-メルカプトプリン	15-30	43.0	90.4	99.3
メソトレキセート	65-94	63.4	101.0	100.8
ドキソルビシン (アドリアマイシン)	34-53	29.3	90.3	99.7
テオフィリン	53-65	71.0	98.6	98.7
プロプラノロール	90-96	25.9	101.0	100.1

物質 (Internal Standard, I. S.) が用いられるが、これが分析対象と全く同等に挙動するという保証はなにもなく、I. S.によって補正することは、屢々気休めに過ぎないのである。

そこで、血中に存在する物質を、蛋白質(P)との結合型 (Protein-Bound, B) と遊離型 (F) との平衡状態、 $B \rightleftharpoons F + P$ をずらすことなく、Fのみを定量するか、あるいは、両者の合計量を定量するか以外に、意義のある分析値はないことになる。

5. 遊離型の定量はどうして行うか。

遊離型のみの定量には二つの方法が考えられる。その一つは、イオン選択性電極 (ISE) のような電位差測定が適用できる場合で、その測定値は活量に関係するが、イオン強度が小さければこれは遊離型の濃度に比例する。しかしこの方法は、リチウムなどごく少数の薬物に限られ、薬物一般を対象とするには、電極自体が開発されていない。

第2の方法は、限外ろ過膜を用いる平衡透析法である。この方法は測定が厄介なので、簡便法として、最近、手軽に加圧又は遠心分離器で限外ろ過できる市販品がある。その一例を図1に示す。

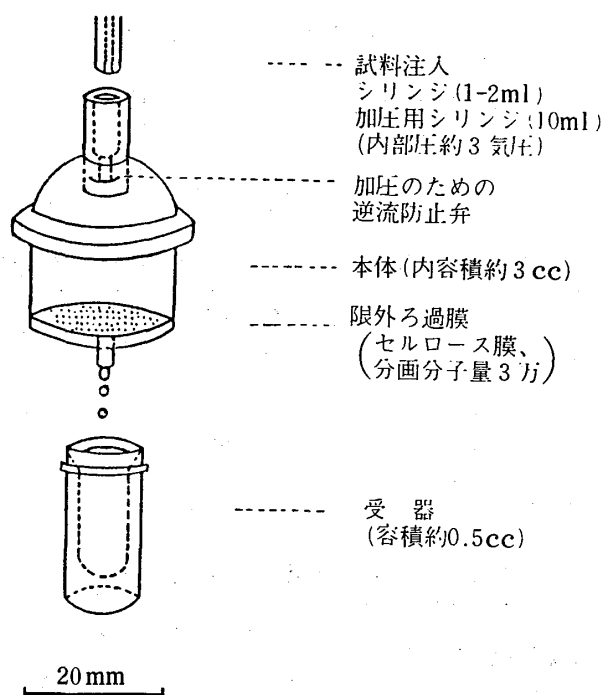


図1 東曹エアープレス型限外ろ過器

この方法ではろ過の進行に伴って、母液中の蛋白質濃度が増加するから、 $B \rightleftharpoons F + P$ の平衡がずれ、ろ過の初めと終りで測定値が変わると考えられる。又、蛋白質や薬物分子がろ過器や限外ろ過膜に吸着することの影響も免れえない。

著者らは、東洋曹達製の簡易限外ろ過器、エアープレス型 (図1) に、薬物を添加した兎血清

1 ml をチャージし、加圧下滴下5滴（約0.2 ml）ごとに分別し、それぞれの 10 μ l を用いて、HPLC で分析した⁹⁾。その結果の概略を表3に示す。表3に見られるように、蛋白結合率の小さい 6-MP や、その値が極端に高い CPZ で、初めと終わりのろ液の分析値の変動が大きく、データの信頼性は低い。蛋白結合率が中間の TP では、比較的文献値に近い測定値が得られている。結論として、この方法は大きな傾向を示すものといえよう。

表3 市販限外ろ過膜により求めた各種薬物の兔血清中蛋白結合率

1ml血清の部分ろ過 ml	蛋白質結合率, %			
	6-メルカプトプリン (6-MP)	テオフィリン(TP)	カルバマゼピン (CBZ)	クロルプロマジン (CPZ)
0-0.2	×60.0	×68.7	72.3	×93.7
0.2-0.4	×46.4	63.3	70.2	97.9
0.4-0.6	×35.7	61.9	×66.7	98.4
0.6-0.8	28.3	61.9	×60.3	98.4
0.8-1.0	22.6	61.9	×49.7	98.4
文献値	15-30	53-65	70-80	95-98

(×印のデータに注意)

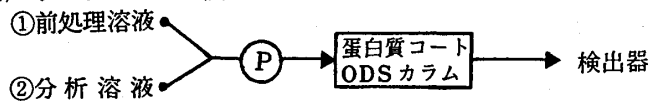
6. HPLC のための新しい除蛋白法。B-F 全量の定量

TDM に HPLC が広く用いられる傾向にあることは既に述べたが、これに関連して、逆相カラム充填剤あるいは他の吸着性ゲルを用い、プレカラムによって除蛋白する方法が、最近盛んになってきている。そしてこれらの方法で特記すべきことは、分析対象がどんなに低いあるいは高い蛋白結合率であろうとそれに関わりなく、遊離、結合の合計総量が定量できることである。この方法はカラム充填剤の特性の違いによって、次のように区分できる。

(1) ゲルろ過 (GPC) 樹脂による除蛋白法

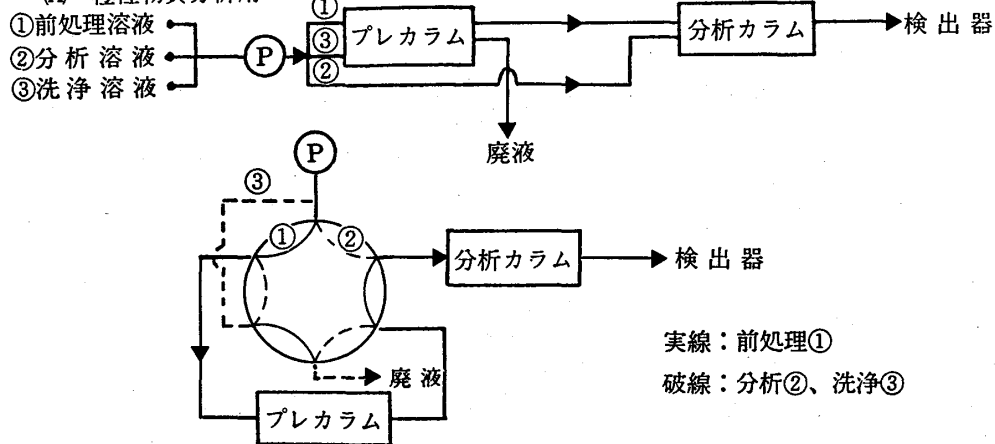
高萩ら¹⁰⁾はゲルろ過 (GPC) に用いる TSK ゲル 2000 SW を 300 mm×9 mm I. D. のカラムに充填し除蛋白に適用している。分子径の大きい蛋白質はゲルを素通りするが、分子径の小さい低分子物質（血清成分や薬物）はゲル細孔内に拡散して溶出が遅れるので、両者を分離できる。蛋白質がこのカラムを通過した時点で、カラムスイッチングして、分析カラムに継ぎ、分析カラム（たとえば ODS シリカを充填した逆相カラム）のトップに低分子分析対象を集め、ついで溶離溶媒に切替えて分析する。これらの操作は完全自動化されて（カラムスイッチングについては図2参照）、セフメタゾール、ワルファリン、カルバジルキノン（カルボコン）などの TDM に適用されている。ワルファリンは97%という高い結合率を有するが、100%の回収率で定量されている。カラム内で蛋白質が遊離型の薬物と分離される段階で、 $B \rightleftharpoons F$ 平衡がずれて、 $B \rightarrow F$ への解離が速

(1) シングルカラム法

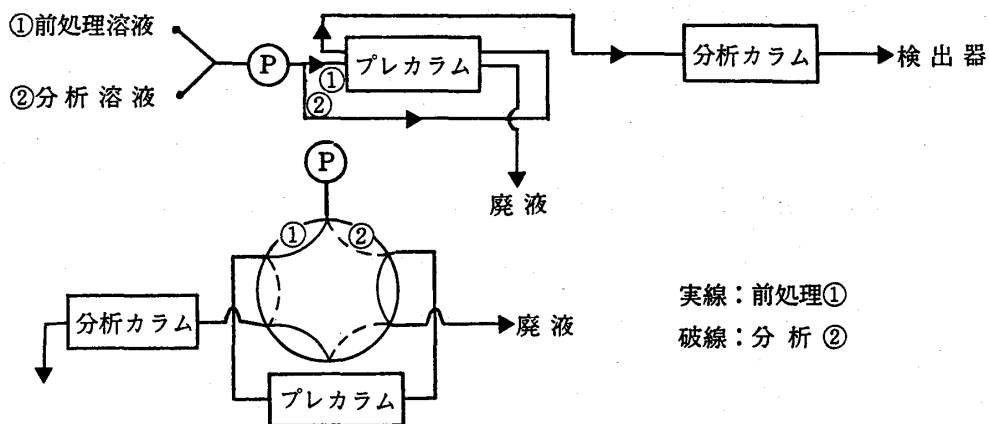


(2) ダブルカラム法

(A) 極性物質分析用



(B) 脂溶性物質分析 (バックフラッシュ法)



(3) トリプルカラム法 (トロイカ法)

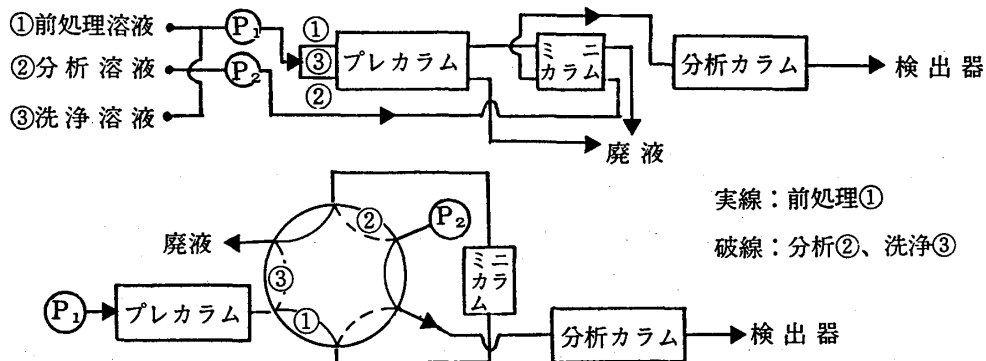


図2 カラム除蛋白とカラムスイッチング

やかに進行するためと考えられる。本法では、分析カラムのトップに分析対象物が捕集されるよう適当な移動相を選択することが肝要であり、又その移動相が適当でないと完全な回収が期待できない。そのため移動相のイオン強度の調整（たとえば 0.1M塩化ナトリウムによる調整）が必要となり、これによって本法の適用が制約されることがある。

(2) 蛋白質コート ODS ゲルによる除蛋白法

多孔性シリカゲルの表面に修飾されたオクタデシル基 ($C_{18}H_{37}$) は BSA など蛋白質と強く相互作用しそれを吸着するが、シリカゲルの細孔径が平均 10 nm 以下と小さいとき、蛋白質 (BSA でそのストークス半径は 3.5 nm とされている。) は、ゲルの外表面には吸着しても、その内表面には侵入できない。その内表面は、低分子物質に対しては、依然として逆相系樹脂としての機能を維持して居り、全体としての吸着機能低下は10%程度に過ぎない。この蛋白質コート ODS ゲルを用いる除蛋白法は、筆者の元の研究室（広島大学医学部）で始めたもので、その本質の解明と共に¹¹⁻¹³⁾、多くの生体成分¹⁴⁻¹⁶⁾、薬物の定量¹⁷⁻²²⁾に適用された。

比較的水溶性の高いセトロニンなども、TCA アニオンとイオン対を形成させると、ODS-ゲルに吸着捕捉することができる¹⁶⁾。脂溶性の高い成分はすべて、本法の対象となり、100%の回収率で定量される。蛋白質コート ODS ゲルに、低分子薬物を捕捉し、そのまま Isocratic に溶離する (6-メルカプトプリンなど²⁰⁾) か、溶離溶媒のみ切かえて分析するか (テオフィリン²⁰⁾、クロルプロマジン²⁰⁾、プロカインアミド^{18,19)}など)、これら単一カラム法に対し、分析カラムへのカラムスイッチングによるか (プロプラノロール²¹⁾、キニジン²²⁾など)、その選択は分析対象及び内因性血中成分の相互分離の必要性によって変る。分析成分によっては、プロプラノロール²¹⁾の単

表4 蛋白質コート ODS カラム (TSK-410 ODS シリカゲル (粒径 20-32 μ m, 孔径約 10nm), 50mm \times 4mm I.D. カラム充填) における性能変化。¹³⁾

薬 物	移 動 相	元の ODS シリカ		BSA コート ODS		血清蛋白質コート ODS	
		k'	N _{eff}	k'	N _{eff}	k'	N _{eff}
プロプラノロール	20% CH ₃ CN 0.1 M リン酸塩 pH 3.0	25.7	355	22.6	128	23.4	117
ドキシソルピシン	25% CH ₃ CN 0.1 M リン酸塩 pH 3.0	7.8	112	8.4	64	9.0	50
メソトレキセート	8% CH ₃ CN PBS	9.5	196	9.5	112	9.5	108
テオフィリン	6% CH ₃ CN PBS	10.5	264	10.2	173	10.5	187

一カラム法の例のごとく繰返し使用によってカラム劣化を生ずることもある²¹⁾。

表4に示すように、蛋白質コートによって Capacity Factor, k' は余り変わらないが、理論段数, N_{eff} は $\frac{1}{2}$ 以下に減少する場合もある¹³⁾。しかし100—300段の理論段数があれば、数成分のメタボライトの分離には通常充分である。カラムスイッチングを行うとき、表面コートした蛋白質〔(その処理法については文献21) 参照〕が溶離溶媒によって剝離し、分析カラムに入ってそれを劣化させないかと案ぜられるが、数100回繰返し使用した結果はその心配は無用のようである。

(3) アクリレート共重合体 (ポリエステル) による除蛋白法。

テトラエチレングリコールジアクリレートとテトラメチロールメタントリアクリレートとの共重合体 (積水化学²³⁾) は、脂溶性物質をよく吸着し、蛋白質や多糖類との分離に利用できる。これをプレカラムに充填して、エストリオールやエストラジオール²³⁾、又は胆汁酸²⁴⁾などステロイド化合物の分析に適用した例が報告されている。その後の研究で²⁵⁾、この共重合体は、(1)pH 2-12 の範囲の0.1Mリン酸塩溶液中でアルブミンを吸着して全く溶出せず、30% CH_3CN によっても変わらない。(2)この吸着は蛋白質のアミドによる水素結合によると考えられ、その吸着活性中心は0.1%トリエチルアミンの1mlによって効果的に抑えられて、蛋白質が容易に脱着する。(3)そのときの蛋白質の脱着溶離のピーク高さは、pH 7 以上で高くなり、pH が10-11になると、pH 7.5 のときの約2倍になるが、50% CH_3CN を加えてもその溶離ピークの高さは殆んど変化しないとされている。

粒径 10-15 μm の本樹脂を 30 mm 長さのカラムに充填し、脂溶性の高い成分は 0.1 M リン酸塩緩衝液、pH 6-8 でそのまま、脂溶性の比較的低い成分には、塩析効果を与えるため 0.5M 硫酸ナトリウムを添加して、蛋白質ともども樹脂に吸着させ、 CH_3CN の適当量を加えた溶離溶媒で、脂溶性成分を溶離する。本法は前法と同じく、脂溶性の高い薬物の TDM に好適である。本法をテオフィリン、リドカインの他、エトスクシミド、プリミドン、フェノバルビタール、カルバマゼピンの混合溶液の溶媒グラジェントによる同時分析 (ただしそのメタボライトは含まれていない) に、 $100 \pm 2\%$ の良い回収率で適用した報告がある²⁵⁾。

(4) 蛋白質と穏やかな相互作用を持つゲルによる除蛋白法。水溶性の高い薬物分析への適用。

薬物の過半数が、脂溶性の物質であるというものの、極めて水溶性の高い薬物もあって、これには前述の方法は適用できない。そこで筆者らは²⁶⁾、最近注目されている、蛋白質と穏やかな相互作用を持つ樹脂による除蛋白法を検討した。本来これらの樹脂は、表面官能基に、水酸基、ニトリル、ブチル、フェニル、ジフェニル基などをもち、蛋白質との相互作用は、水素結合、疎水性相互作用などの穏やかな相互作用のため、酵素蛋白質や抗体蛋白質の分離精製に用いてその活性が害われることが少いことで注目されているものである。

ブチル基を表面官能基とする TSK ブチルトヨパール (BT) 650-M に蛋白質を吸着させるには、従前から知られている方法として、5-50%飽和硫酸アンモニウムの添加があるが、このように高濃度の塩の添加は爾後の分析を妨害することがあって奨められない。これに対し筆者らは、0.05-0.75%の TCA, 0.025-0.5%の PCA, その他 TFA, タングステン酸塩, モリブデン酸塩などが5-50%飽和硫酸アンモニウムと同様に効果的であることを見出した。PCA 0.5%を用いるとき、36 mgの BSA が 1cc の湿潤樹脂に吸着される。薬物は極めて脂溶性の高いものを除いて BT650-M に吸着されないから、BT 650-M のプレカラム (50 mm×4 mm I. D.) を通過して、イオン交換樹脂や ODS ゲルを充填したミニカラム (10 mm×4 mm I. D.) に捕集される。BT650-M は耐圧性が低いので、除蛋白と試料物質捕集は、プレカラムにミニカラムを継いで低圧下で行い、その後でカラムスイッチして、Back-flush (逆流) モードでミニカラムを分析カラムに継ぎ、溶離溶媒を流して分析する。この3本立カラム (Troika System) を図2の(2)Cに示す。

本法で用いた低濃度の蛋白質沈殿剤による変性は、BT650-M への吸脱着に関する限り可逆的なものであって、TCA や PCA を含む移動相から、純水に変えると蛋白質は容易に溶離する。この溶離に当って、0.18-0.2Mリン酸塩溶液による塩溶効果、30%CH₃CN や MeOH による溶媒効果は、溶離ピークの高さをそれぞれ15倍、4倍と高める。又、3-7M尿素溶液を用いると、溶離ピーク高が 2-2.5倍と溶離し易くなることから、水素結合による吸着も寄与しているものと考えられる。これらの事実から、プレカラムの再生処理には、0.2Mリン酸塩緩衝液に30%CH₃CN を加えて用い、ときに 0.2M水酸化ナトリウムを流すことにより、プレカラムの極めて良い再生復元が行われる。

この方法は、生体組織中のヒスタミンやポリアミンの定量²⁶⁾にも適用されるが、6-メルカプトプリン²⁶⁾、テオフィリン²⁶⁾、ゲンタマイシン²⁷⁾などに、100%の回収率で適用された。エトスクシミド、プリミドン、フェノバルビタール、カルバマゼピンを含む幅広い脂溶性の混合試料への適用は前3者のみ、あるいは後3者のみについては可能であったが、全体の同時分析は困難であった。又、カルバマゼピンやクロルプロマジンのように脂溶性の高い薬物は、0.1Mリン酸塩緩衝液 (pH~7.0) の移動相によって、蛋白質は吸着せず、クロルプロマジンのみが樹脂に吸着するので、蛋白質との分離ができる²⁶⁾。

サイクロスポリンの血中濃度測定について、活性炭吸着による方法など^{28,29)}の他、シリカゲル-CN をプレカラムに用いる近藤ら³⁰⁾の研究があり、回収率97.5%が報告されている。

これら、蛋白質とマイルドに相互作用する各種充填剤について、今後体系的な検討が望まれる。

以下、筆者らの行ってきた HPLC を中心とする TDM の実験方法の要点を表5にまとめて掲載する。

表 5. 当研究室を主体とする TDM の実際

(DL: 検出限界, CV: 日内変動係数, t_R : 保持時間, UV: 紫外吸収, F: 蛍光, EC: 電気分析,
PB: リン酸塩緩衝液, PBS: 0.15 NPB (pH 7.4) 0.4 ℓ + 0.9% NaCl 4 ℓ , CB: クエン酸塩緩衝液。)

薬 物	代 謝 体	血中治療濃度	蛋白結合率%	検 出 法	分 離 法	文 献 番 号
抗けいれん薬 Anticonvulsants	ここでは、主 薬のみの混合 物を扱った。				HPLC シングルカラム 蛋白質コート	今井, 吉田, 玉井, 渡辺
エトスクシミド (ESM)	活性代謝物なし	40~100 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$	極めて小	UV 205nm	TSKゲル ODS	(恭子)未発表
プリミドン (PRM)	フェニルエチル マロニルアミド	3~ 12 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$	19%	205nm	120T (5 μm)	データ
フェノバルビタール (PB)	グルクロン酸, 硫酸抱合体	10~ 25 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$	50%	205, 240nm	150 \times 4mm	
フェニトイン (PHT)	フェニルヒダント イン誘導体	10~ 20 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$	70~90%	205nm	I.D.	
カルバマゼピン (CBZ)	エポキシド等	5~ 10 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$	70~80%	217, 285nm	(カラム温度 30 $^{\circ}\text{C}$)	
(操作法)	図 2 (2) B 方式で PBS を移動相として、血漿試料 50 $\mu\ell$ を注入する。以下流速 1.0 $\text{m}\ell/\text{min}$ で第 1 溶離溶媒 (PBS+1% CH_3CN により、ESM (溶媒切替後の t_R -9min) を UV 220 nm, 0.08 AUFS で検出、ついで第 2 溶離溶媒 (PBS+7% CH_3CN) に切替え、PRM (第 2 溶離溶媒に切替後の t_R '-14min), PB (t_R '-21min) を UV 220nm, 0.08 AUFS で検出、最後に第 3 溶離溶媒 (PBS+25% CH_3CN) に切替えて PHT (第 3 溶離溶媒に切替後の t_R '-9min), CBZ (t_R '-12min) を UV 220nm, 0.16 AUFS で検出する。回収率は 100~102.1%, CV 1% 内、溶媒グラジエント法では、ピーク高が変動し易い。					
クロルプロマジン (CPZ)	S-オキシド N-オキシド	50~300 ng/ $\text{m}\ell$	95~98%	EC 0.8V	HPLC シングルカラム 20~32 μm ODS シリカ, 50 \times 5 mm I.D.,	20
(操作法)	図 2 (1) 方式で、移動相 (0.1M PB(pH 5.0)) で血漿試料 50 $\mu\ell$ を注入し、移動相を 0.1 MPB(pH 5.0)+50% CH_3CN に切かえて溶離、EC 検出 (0.8V) は S-オキシド生成を使うので、代謝体の検出はできない。回収率は 101.6%, 検出限界 100ng/ $\text{m}\ell$ (C.V. 3.6%)					
ドキシソルピシン (アドリアマイシン, ADM)	アグリコン	3~15 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$	34~53%	EC 0-0.9V サイクリック ボルタンメ トリー	2 段溶媒抽出 電極吸着法	31
(操作法)	血漿試料 0.5 $\text{m}\ell$ を 1M-HCl で pH~3 とし 10 $\text{m}\ell$ の CHCl_3 で抽出、水相に 0.1g Na HCO_3 を加えて pH 約 8 とし、再度 CHCl_3 10 $\text{m}\ell$ で抽出、有機相を取り蒸発、pH 7.4, 0.5 $\text{m}\ell$ PB に溶解する (A)。予じめ CB-pH 6.0 中で 1.4V, 25 分間電解酸化処理したグラッシ-カーボン電極 (東海カーボン GC-20, 3mm ϕ) を、1,000r.p.m. で回転しつつ、10 分間試料液 (A) に浸漬して ADM を吸着させる。電極を水洗、pH 2.0 の CB 中で 200mV/s の電位変化速度で 0~0.9V vs. Ag/AgCl を掃引、再還元液高によって定量する。DL は 10nM (5 pmol) CV 3%(100nM), 回収率は 95%。					
ゲンタマイシン (G)	—	4~12 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$	約 10%	F(OPA) との 反応、反応コ イル内径 0.5 mm 1.5m OPA 溶液の 流速 0.8 $\text{m}\ell/\text{min}$, λ_{ex} 345nm λ_{em} 433nm	HPLC プレカラム BT650-M 50 \times 4mm I.D. 分析カラム TSK 120A (ODS, 5 μm) 50 \times 4mm I.D. (50 $^{\circ}\text{C}$)	27
(操作法)	図 2 (2) A 方式で、移動相 (0.4%過塩素酸+8mM ペンタンスルホン酸ナトリウム, PS) を流して、血清試料 50 $\mu\ell$ を注入し、ゲンタマイシン-Cl, Cla, C2 のペンタンスルホン酸とのイオン対を分析カラムのトップに捕集する。プレカラムを切離し、分析カラムは溶離溶媒 (PS 8mM+酢酸 20mM+硫酸ナトリウム 10mM) を 5min 流して、内因性の血清成分を溶離させた後、(PS 8mM+酢酸 20mM, 硫酸ナトリウム 40mM) へ 6min 間にわたりグラジエントをかける。その後、この溶媒を 8min 流す。溶離した G-Cl (t_R -20.9min), Cla (t_R -17.0min), C2 (t_R -19.1min) は OPA との反応の後 λ_{ex} =345nm, λ_{em} =433nm で検出される。本法の回収率は 97.8~102.5%, CV=1.3~3.2% である。実験後 プレカラムを 0.1M PB (pH 7.0)+20% MeOH で洗浄 (10min) し、その後水洗する。					

6-メルカプトプリン (6-MP)	チオ尿酸 6-メチルメル カプトプリン	1~20 μ g/ml	15~30%	UV 319nm	HPLC シングルカラ ム 20~32 μ m ODS シリカ 50 \times 5mm I. D.	20
(操作法)	図2(1)の方式で、0.1 MCB (pH 7.4) を移動相として、血漿試料 10 μ l を注入する。流速 0.8ml/min で、当初クレアチン、クレアチニン、尿酸等の血中成分と共にチオ尿酸が溶離し、6-MP は t_R -6min で isocratic に溶離し、UV 319nm で検出される。内標 6-メチル-チオ-2-ヒドロキシプリン (MTHP) の t_R は同条件下で 18min である。6-メチルメルカプトプリンは溶媒を 0.1M CB (pH 7.4)+5% CH ₃ CN に切替えて、UV 296nm で検出される。6-MP の DL 0.2 μ g/ml, CV 1.4%, 回収率は 100.8% である。					
メソトレキセート (MTX)	7-ヒドロキシ - MTX, ま れに APA (2,4-ジアミノ - N ¹⁰ -メチ ルプロテン酸)	数 mM ~10 ⁻⁴ mM	65~94%	UV 303nm	HPLC プレカラム, 蛋白質コート ODS (15 μ m) 150 \times 4mm I. D., 分析カラ ムケムコンソ ルブ ODS (5 μ m) 300 \times 4 mm I. D.	今井, 吉田, 玉井, 白井 (美智子) 未発 表データ
(操作法)	図2(2)B方式で、移動相 (CB pH 3.2) を流して、血漿試料 100 μ l を注入、CB (pH 5.0) +CH ₃ CN 1%+THF (テトラヒドロフラン) 1.8%を Back Flush モードで溶離させる。初にプラズマ成分、ついで MTX (t_R -6.0min), 7-OH-MTX (t_R -13.5min) の順に溶離する。回収率 100.0%, CV 0.9%					
プロカインアミド (PA)	N-アセチル プロカインア ミド (NAPA)	4~10 μ g/ml	14~16%	UV 270nm	HPLC シングルカラ ム蛋白質コート ODS (5 μ m) 50 \times 4 mm I. D. (カ ラム温度 30 °C)	19
(操作法)	図2(1)の方式で、移動相 (0.1 M PB+0.25% TCA (pH 3.0)), 1.5ml/min で血漿試料 25 μ l を注入、6min 後 (0.1 M PB+0.25% TCA (pH 3.0) +3.5% CH ₃ CN) に溶離溶媒を変えて 15min 流す、PA の t_R -3min (溶媒切替後), APA の t_R -20.5min, 要すれば I.S. として 8-クロロテオフィリン (t_R -5min) を用いる。回収率は PA 101.8% (CV 1.1%), NAPA 99.3% (CV 1.4%), I.S. 100.3%)。					
プロプラノーロール PROP	4-ヒドロキシ PROP	50~100 ng/ml	90~96%	F (蛍光計 2 台を直列に用 いる) (λ_{ex} 297nm (λ_{em} 347nm (λ_{ex} 327nm (λ_{em} 427nm	HPLC プレカラム, 蛋白質コート ODS (10 μ m) 60 \times 4mm I. D. 分析カラム, ODS (5 μ m) 60 \times 4mm I. D. (35°C)	21
(操作法)	図2(2)B方式を用い、移動相を PBS, 1.2ml/min で血漿試料 250 μ l を注入、5min 後、カラムを PBS+15% CH ₃ CN (2min), 0.1 CB (pH 4.0) +5% CH ₃ CN (4min) を用いて洗浄する。そのあとで分析カラムを継ぎ、溶離液 (0.1 M CB (pH 4.0) +15% CH ₃ CN) を 1.7ml/min で流し、PROP 及び 4-OH-PROP を別々の蛍光計で、それぞれ λ_{ex} 297nm λ_{em} 347nm 及び λ_{ex} 327nm, λ_{em} 427nm で検出する。4-OH PROP の t_R -2min, PROP の t_R -6min, PROP の回収率は 100.1%, CV 0.9% である。					
キニジン Q (製剤中に夾物として ジヒドロキシキニジ ンを含む)	3-OHQ など 8種	2~6 μ g/ml	70~80%	F λ_{ex} 350nm λ_{em} 440nm UV 260nm, 340nm	HPLC プレカラム, 蛋白質コート ODS (20~32 μ m) 60 \times 4m m I. D. 分析カラム, ODS (5 μ m) 60 \times 4mm I. D. (35°C)	27

(操作法)	<p>図2(2)B方式を用い、移動相を PBS 1.5ml/min として、体液試料 20~100μl を注入、5分後、分析カラムを接続し、溶離溶媒 1 (0.1 M CB (pH 3.7) + 3% CH₃CN) を 15min、次いで溶離溶媒 2 (0.1 M CB (pH 2.8) + 6% CH₃CN) を 25min 流す。各成分の溶離パターンを図3-1に、また血清及び尿試料の溶離パターンをそれぞれ図3-2、3-3に示す。2'-キノジノンλ_{ex} 360nm, λ_{em} 430nm で検出される。O-デスメチル体(VI)は無蛍光でUV 吸収は内因性成分と重なるので、測定できない。回収率は各成分で 98.3~102.5%にわたるが平均 100% (CV 1.6~4.0%) である。</p>					
テオフィリン (TP)	1-メチル尿酸 3-メチルキサンチン	5~20 μ g/ml	53~65%	UV 273nm 又は EC	HPLC シングルカラム 蛋白質コート ODS (20~32nm) 65 \times 5mm I. D.	20
(操作法)	<p>図2(1)方式により、0.1 M PB (pH 7.4), 0.8ml/min. を移動相として、血漿試料 50μl を注入する。図4に示すごとく、代謝体の1-メチル尿酸は、数分内に尿酸等内因性成分のピークの肩に現われ、代謝体の3-メチルキサンチンも t_R-16min の内因性成分の直後に現われる。24min 後溶離溶媒を PB (pH 7.4) + 6% CH₃CN に変えて、I. S. 8-クロロー TP の後に、t_R-約8minで TP が現われる。兎血漿には存在しないが、人血漿を用いるとき、血漿ブランク中に 0.03μg 相当の TP が現われる。これは、コーヒー、茶などの嗜好品のカフェインが脱メチル化して生じた TP と考えられる。添加回収率は 100.2% (CV 1.1%)。</p>					

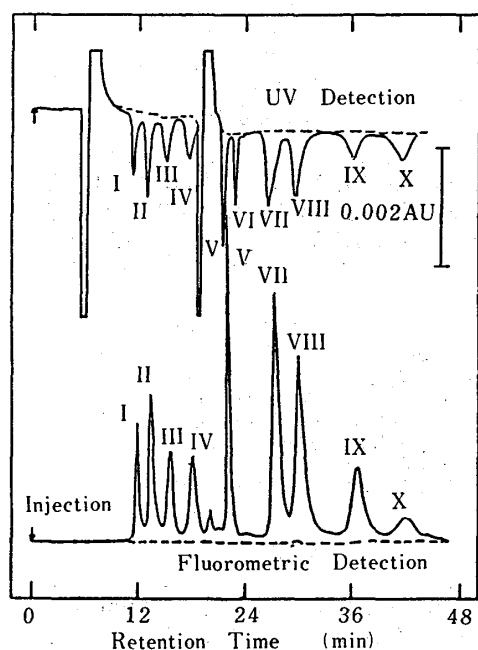


図3-1 キンジンの夾雑物及び代謝体の HPLC
(標準試料), 各成分とも 0.5nmol

- I 10,11-dihydrodiol quinine N-oxide glucuronide
- II 10,11-dihydrodiol quinidine glucuronide
- III 10,11-dihydrodiol quinidine N-oxide
- IV 10,11-dihydrodiol quinidine
- V 3-hydroxyquinidine
- VI O-desmethyl quinidine
- VII quinidine N-oxide
- VIII quinidine
- IX dihydroquinidine
- X 2'-quinidinone

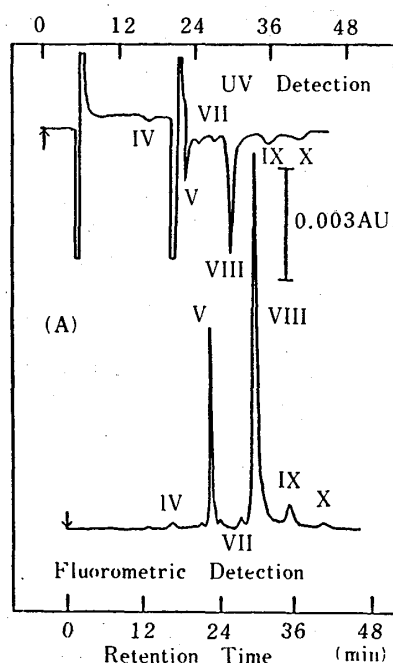


図3-2 患者全血中のキニンとその夾雑物及び代謝体の HPLC

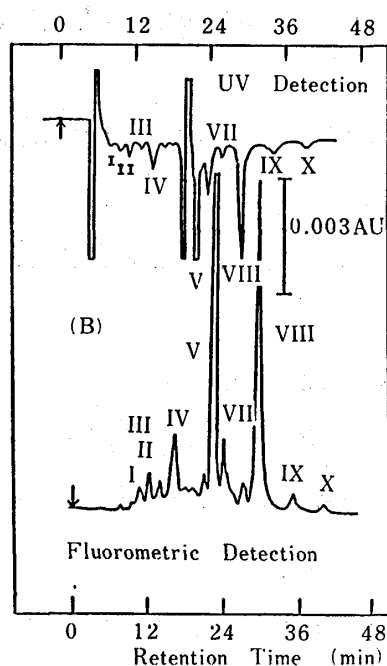


図3-3 患者尿中のキニジンとその夾雑物及び代謝体の HPLC

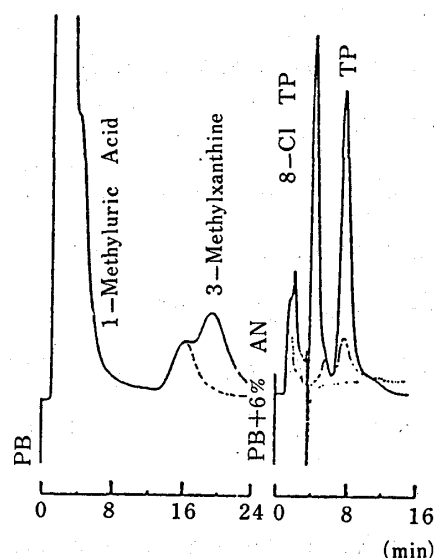


図4 テオフィリンのHPLC (8 Cl-TP は I. S.), 各成分とも 2.5nmol

文 献

- 1) H. Breithaupt, E. Küenzlen and G. Goebel, *Anal. Biochem.*, **121**, 103 (1982).
- 2) 菅家甫子, 吉富博則, "ドラッグデリバリーシステム", 福山大学薬学部研究年報, 第3号, p. 1-22 (1985).
- 3) W. Sadée and G. C. M. Beelen, "Drug Level Monitoring", A. Wiley-Intersci. Publ., New York, (1980).
- 田村善蔵, 齊藤正行監訳 "ドラッグレベルモニタリング", 広川書店 (1982), 東京, pp. 357.
- 4) 田村善蔵, 堀岡正義編 "薬物治療適正化のための一薬物血中濃度測定の実際", 産業時報社 (1981), 東京, pp. 306.
- 5) R. Y. Calne, D. J. G. White, S. Thirn, D. B. Evans, P. McMaster, D. C. Dunn, G. N. Graddock, B. D. Pentlow and K. Rollers, *Lancet*, ii, 1323 (1978).
- 6) L. D. Bowers and D. M. Conafax, *Ther. Drug Monit.*, **6**, 142 (1984).
- 7) I. Morita, T. Masujima, H. Yoshida and H. Imai, *Bunseki Kagaku*, **33**, E235 (1984).
- 8) 神代昭, 西岡幹夫編 "臨床薬物ハンドブック", 医歯薬出版 (1982), 東京, pp. 312.
- 9) 今井日出夫, 桜幸子, 玉井元, 山根利枝, 未発表データ。
- 10) 高萩英邦, 黒崎かおる, 繁原英治, 河合賢司, 駒井享, 田中実, 第15回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム (昭和58年11月, 広島) 講演要旨集, p. 177 (1983).

- 11) 吉田久信, 隅田利彦, 玉井元, 森田幾江, 升島努, 今井日出夫, 日本臨床化学会年会記録第22集, p.70 (1982).
- 12) H. Yoshida, A. Nagami, I. Morita, T. Masujima and H. Imai, *J. Pharm. Dyn.*, **7**, 8 (1984).
- 13) H. Yoshida, I. Morita, G. Tamai, T. Masujima, T. Tsuru, N. Takai and H. Imai, *Chromatographia*, **19**, 466 (1984).
- 14) 吉田久信, 今井日出夫, 薬理研究会助成研究報告, 第20集, p.21 (1983).
- 15) I. Morita, T. Masujima, H. Yoshida and H. Imai, *J. Pharm. Dyn.*, **5**, 29 (1982).
- 16) H. Yoshida, I. Morita, T. Masujima and H. Imai, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3827 (1982).
- 17) H. Yoshida, I. Morita, T. Masujima and H. Imai, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2287 (1982).
- 18) 吉田久信, 高野啓子, 玉井元, 森田幾江, 升島努, 今井日出夫, 日本臨床化学会年会記録第22集, p. 72 (1982).
- 19) H. Yoshida, K. Takano, I. Morita, T. Masujima and H. Imai, *Jap. J. Clin. Chem.*, **12**, 312 (1983).
- 20) H. Imai, H. Yoshida, T. Masujima, I. Morita, K. Matsuura, A. Nakamaru, K. Katayama and H. Matsuo, *Anal. Lett.*, **16**, 1109 (1983).
- 21) G. Tamai, I. Morita, T. Masujima, H. Yoshida and H. Imai, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1825 (1984).
- 22) G. Tamai, H. Yoshida, H. Imai, T. Takashina, K. Kotoo, T. Fuwa, Y. Tsuchioka, H. Matsuura and G. Kajiyama, *Chromatographia*, **20**, 671 (1985).
- 23) T. Dohji, M. Fushimi, T. Kawabe and F. Kamiyama, *J. Chromatogr.*, **311**, 249 (1984).
- 24) S. Hasegawa, R. Uenoyama, F. Takeda, J. Chuma, K. Suzuki, F. Kamiyama, K. Yamazaki and S. Baba, *J. Liq. Chromatogr.*, **7**, 2267 (1984).
- 25) 北村宏行, 林守正, 三上博久, 石田泰夫, 分析化学, **35**, 236 (1986).
- 26) 玉井元, 吉田久信, 今井日出夫, 第7回生体成分の分析化学シンポジウム (昭60年9月, 東京) 講演要旨集, p.115 (1985), 分析化学, **35**, 335 (1986).
- 27) G. Tamai, H. Yoshida and H. Imai, in preparation.

- 28) G. Hamilton, E. Roth, E. Wallisch and F. Tichy, *Chromatogram (Beckman)*, **6**, 2 (1985).
- 29) M. K. Aravind, J. N. Miceli and R. E. Kauffman, *J. Chromatogr.*, **344**, 428 (1985).
- 30) 近藤孝子, 打田和治, 阿知波雅人, 前田和男, 奥田剛, 高木弘, 日本臨床化学会年会報告, 第24集, 39 (1984).
- 31) 平野伸二, 升島努, 吉田久信, 今井日出夫, *分析化学*, **35**, 167 (1986).