

同位体分離法による合成麻薬性鎮痛薬フェンタニルの 同位体希釈分析法の開発とその応用

世 良 庄 司

Development and application of isotope dilution analysis for fentanyl by isotopic fractionation.

Shoji Sera

Abstract

Advantages of isotope dilution analysis for fentanyl (FT) and its main metabolite, norfentanyl (Nor-FT) were demonstrated. Isotopic fractionation for isotope dilution analysis was examined by separation of FT and its deuterated analogue using capillary gas chromatograph. The separation of FT and seven kinds of deuterated FTs were proportional to the number of labeled deuterium atoms and inversely to the temperature of the column oven. The propionyl group was more effectively position of deuterium labeling for isotopic fractionation than anilino or phenylethyl groups. The quantitative determination of FT in serum and urine was examined by GC equipped with a surface ionization detector (SID). For an analysis of Nor-FT in urine, *N*-alkylation was necessary to detect sensitively by SID. Methyl derivative was selected from 3 kinds of *N*-alkyl derivatives to increase sensitivity and peak resolution, and to prevent interference with urinary compound. No endogenous compounds or concomitant drugs interfered with the detection of FT and Nor-FT in the serum or the urine of patients. Furthermore, pharmacokinetics of FT was solved with the present method by two-compartment model built into metabolic process.

1. はじめに

安定同位体は放射性同位体と比較し、放射線被曝を受けない、法的規制を受けない、化学形を反映した情報が得られる、ヒトへの応用が可能などの利点を持っている。放射性同位体トレーサ法では放射能のみを指標とするため非標識体との物理化学的相違が検出されることは希であるが、安定同位体トレーサ法では標識体と非標識体との割合を測定するため、両者の相違が認められる機会が多い。特に高分離能を有するガスクロマトグラフィー (GC) や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の分離能が向上するに従い、従来は全く問題とされなかった僅かな性質の相違が明らかに変化として観測されるようになった¹⁾。この現象を利用したキャピラリーGCによる同位体分離法は、特に安定同位体の測定についてGC-MSやNMRとは異なった特徴を有し、従来特殊な測定が問題であった臨床診断への利用が可能であると思われる。

合成麻薬性鎮痛薬フェンタニル (FT) は投与量が5-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と少なく、患者血清中濃度も数ng/ml程度である。現在、FTには簡便でルーチンに適した有効な測定法がなく患者における体内動態については不明な点が多い。FTの測定の困難さの原因はその濃度が低く高感度が要求される点と、試料調製段階での吸着による損失が著しい点である。このようなFTに対して本論文では、キャピラリーGCを用いた同位体分離法による同位体希釈分析について、重水素標識FTの選択から、血清中FT測定におけるその利点の確認、尿中FTおよび主代謝物Nor-FTへの応用、臨床の場合におけるFTの動態の解明まで、の一連の検討を行うことによりその有用性を示した。

2. キャピラリーガスクロマトグラフィーによるフェンタニルの重水素標識体分離

2-1. 同位体分離におけるカラム温度と重水素標識数の影響

キャピラリーGCにおいて、多くの場合重水素標識体 (D体) の保持時間は非標識体 (H体) より短く、分子全体に占める重水素の割合が多いほど分離しやすいとされているが、その詳細な検討についてはほとんど報告されていない。

そこで、Fig.2-1.に示すFTおよびそのD体であるFT-ani.-²H₅、FT-phe.-²H₅、FT-pro.-²H₅、FT-²H₁₀、FT-²H₁₅、FT-²H₁₇、FT-²H₁₉を合成し、これらD体とH体のキャピラリーGCにおける同位体分離について、カラム温度や重水素標識数等の影響を検討した。

固定相の異なる2種類のキャピラリーカラム (CBP1およびCBP5) を装備したGCを用いカラム温度260℃におけるFTと重水素標識FTの分離を検討したところ、Fig.2-2.に示すように、CBP1カラムの方がCBP5カラムに比べて保持時間が短くなっているが、いずれも重水素標識数に依存して保持時間が早くなる現象が観察された。

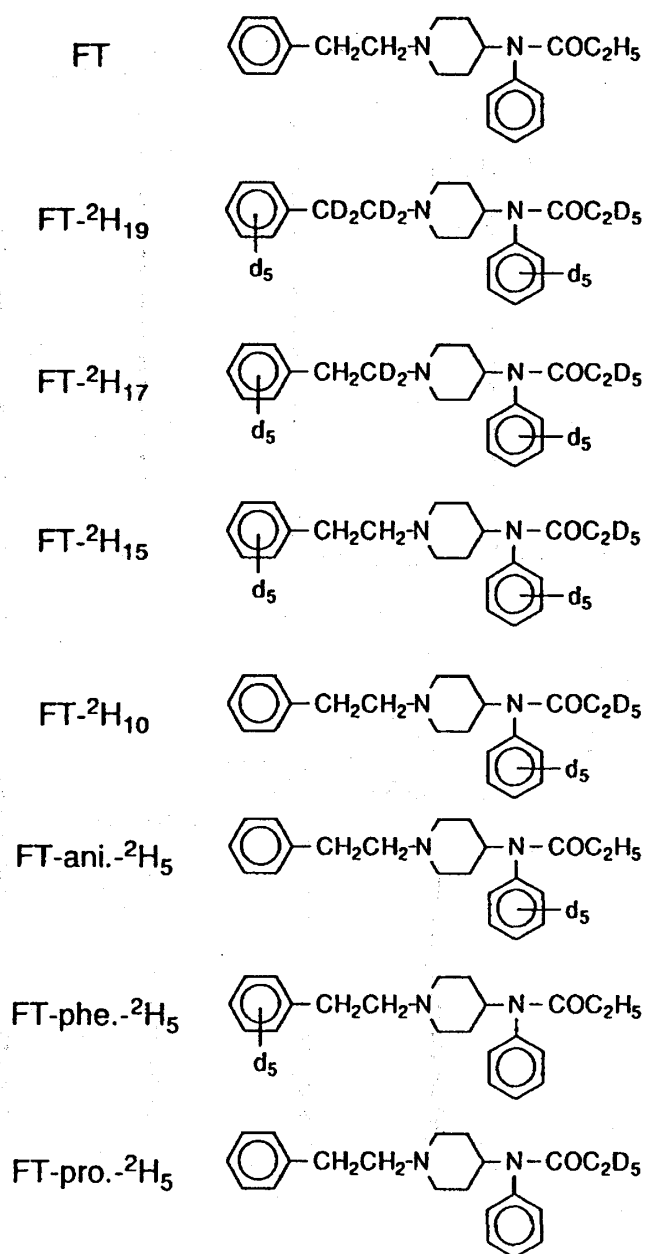


Fig. 2-1. Chemical structures of FT and deuterated FT.

2-2. FTの同位体分離における熱力学的考察

これまでの報告でも、分子内の標識重水素数が多いほどGCにおける同位体効果は大きくなることが確認されているが^{2, 3)}、標識位置による影響についてはこれまでに検討されていない。そこでFTについてもこの同位体効果と標識位置、標識数の関係について熱力学的解析を行い、最も効率的な同位体分離測定を行うことを計画した。

種々のカラム温度におけるFTと標識体の保持時間を測定し分離係数 α を求め、 α の対数

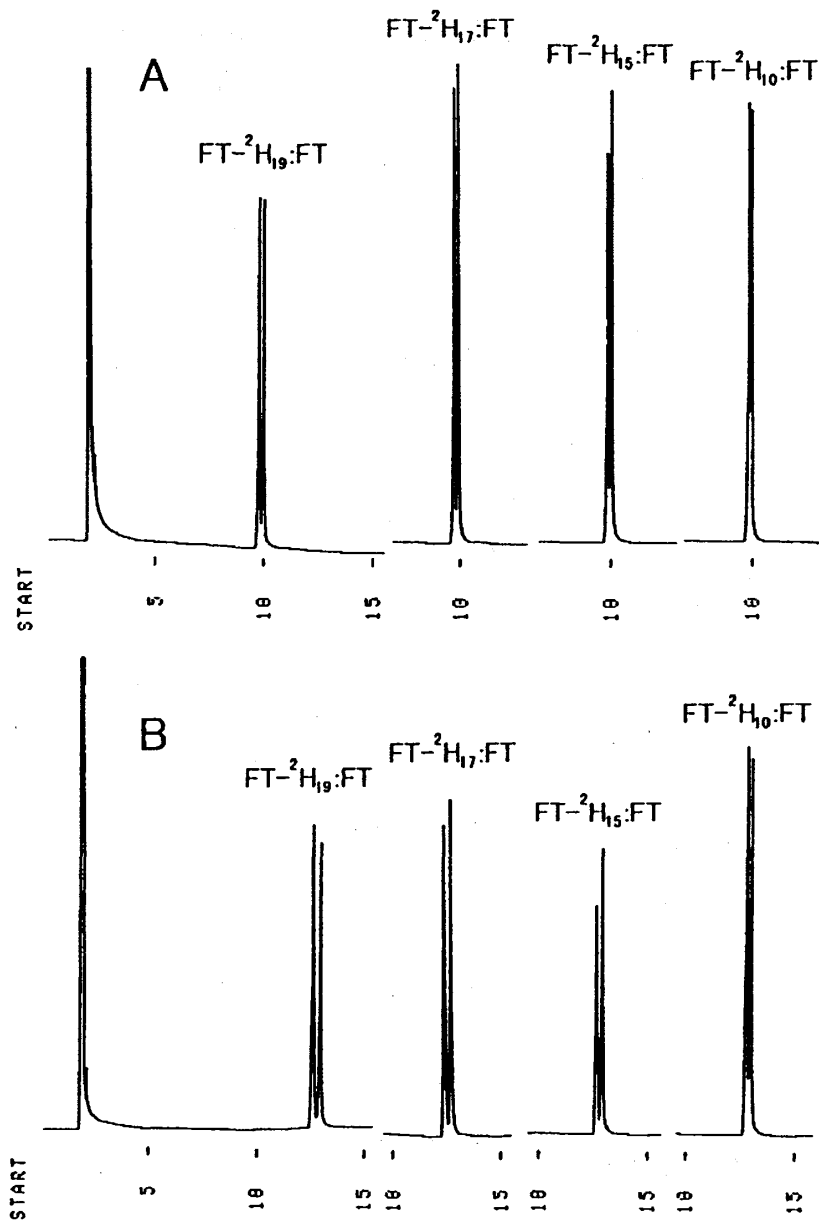


Fig. 2-2. Gas chromatographic separation of FT and its deuterated analogue at column temperature 260°C.
A:CBP1 column B:CBP5 column

をカラム温度の絶対温度の逆数に対してプロットした例をFig.2-3.に示す。CBP1カラム、CBP5カラムのいずれにおいても $\ln \alpha$ は $1/T$ に対して直線関係を示し、直線の傾きよりD体のエンタルピー変化とH体のエンタルピー変化の差 $\Delta \Delta H$ を求めた。また特定のカラム温度(230°C、260°Cおよび280°C)におけるD体の自由エネルギー変化とH体の自由エネルギー変化の差 $\Delta \Delta G$ の値も算出した。各標識体について得られた $\Delta \Delta H$ および $\Delta \Delta G$ の値をTable 2-1.に示す。両カラムとも標識重水素数が増加するに従い $\Delta \Delta H$ および $\Delta \Delta G$ 値も増加して

いるが、この場合の自由エネルギー変化は溶質の気相から固定相への移行過程についてのものであることから、FTに比べて各標識体は液相への分配が減少していることを示している。

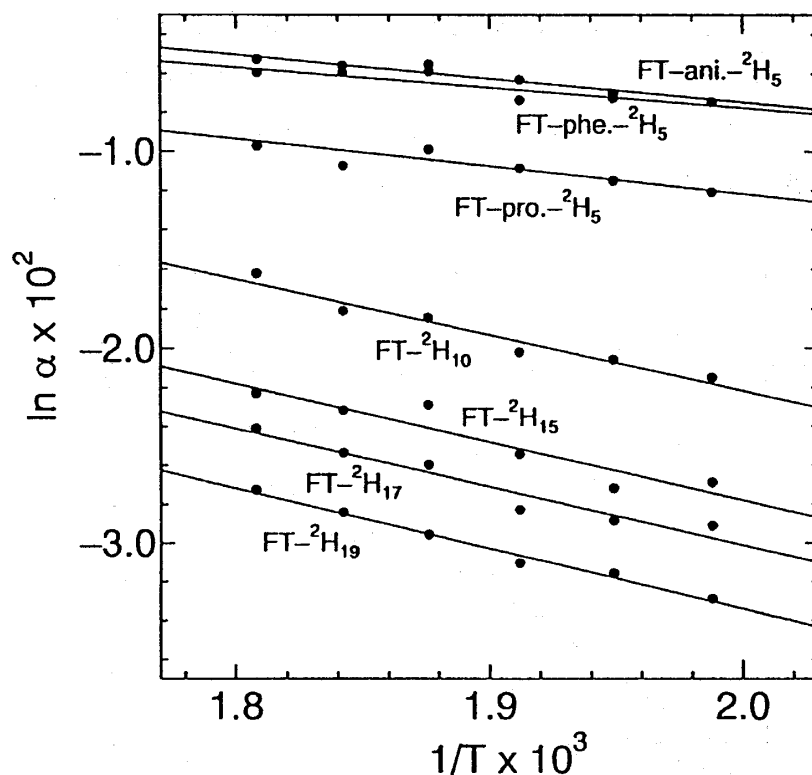


Fig. 2-3. Effect of column temperature (T in Kelvin) on the separation of FT and its deuterated analogue in the CBP1 column.

Table 2-1. Thermodynamic parameters of FT and its deuterated analogues in CBP1 and CBP5 columns

	CBP1				CBP5			
	$\Delta\Delta H$ (cal/mol)	$\Delta\Delta G$ (cal/mol)			$\Delta\Delta H$ (cal/mol)	$\Delta\Delta G$ (cal/mol)		
		230°C	260°C	280°C		230°C	260°C	280°C
FT-ani.- ² H ₅	11.4	9.3	9.6	9.3	15.2	9.0	7.8	7.5
FT-phe.- ² H ₅	22.8	11.2	10.0	10.1	20.1	8.8	7.5	7.7
FT-pro.- ² H ₅	17.1	14.8	14.3	14.2	24.6	14.0	13.2	12.4
FT- ² H ₁₀	56.6	21.6	19.7	17.8	40.4	22.0	20.6	19.6
FT- ² H ₁₅	59.8	26.9	24.3	24.5	43.5	28.2	27.7	26.4
FT- ² H ₁₇	61.2	29.2	27.6	26.4	61.1	33.3	30.5	28.9
FT- ² H ₁₉	62.3	32.9	31.3	30.0	64.3	36.1	34.5	32.2

2-3. 標識位置における分離性の変化

Fig.2-4.にCBP1およびCBP5カラムの280℃における各重水素標識FTの $\Delta\Delta G$ 値と、その標識重水素数の関係を示す。FT-ani.- $^2\text{H}_5$ およびFT-phe.- $^2\text{H}_5$ を除いて、 $\Delta\Delta G$ 値には標識重水素数と直線関係が認められた。直線の傾きから重水素1個あたりの $\Delta\Delta G$ 値を求めたところ、CBP1では1.13cal/mol、CBP5では1.40cal/molであったのに対し、FT-pro.- $^2\text{H}_5$ から求めた値はCBP1では2.84cal/mol、CBP5では2.48cal/molと他の部位に比較し2倍以上の効果があることが認められた。

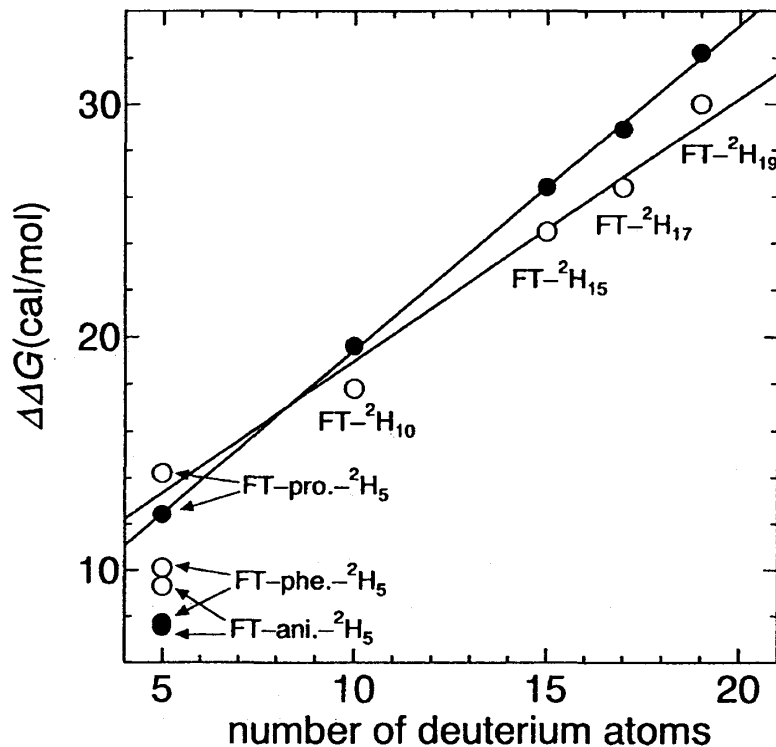


Fig. 2-4. Effect of labeled deuterium atoms on $\Delta\Delta G$ of deuterated FT at 280°C.

○:CBP1 ●:CBP5

以上の結果から、FTの重水素標識における同位体分離は、特にプロピオニル基への標識が効果的であるものの、より多くの重水素を標識した方が効果が大きいことが確認された。よって今回用いたFTの重水素標識体では、FT- $^2\text{H}_{19}$ が同位体分離を行う上で最適であることが明らかとなった。

3. キャピラリーGCを用いた同位体希釈分析法による血清中フェンタニルの定量

3-1. GCによる同位体分離法の同位体希釈分析法への応用

これまでに報告されたFT測定法については、測定キットの市販されているRIA⁴⁻⁶⁾や各

種検出器を装備したHPLC^{7, 8)}、GC^{5, 9, 10)}等がある。それらの報告によると臨床において使用されるFTの体内動態を解析するためには、最低でも100-200pg/ml程度の血清あるいは血漿中濃度の測定が必要であるとされている。同位体希釈分析法の利点は、標識体を内部標準に使うことにより、抽出および吸着等の影響を受けにくく再現性に優れることである。またそのキャリアー効果により吸着や抽出時の損失を少なくできる利点を持つ。そこで最も良い分離が認められたFT-²H₁₉を用い、FTの同位体希釈分析を行った。

FTの検出には、3級アミンに特異的である表面電離型イオン化検出器 (SID)¹¹⁾を用いた。SIDの感度を水素炎イオン化検出器(FID)と比較すると、FTの場合で300-1000倍の感度を持つと報告¹²⁾されており、また窒素・リン検出器 (NPD) に比べてもその感度はコデインの場合で約10倍の感度を持ち、血漿・尿中物質の妨害を受けにくいと報告¹³⁾されている。なお、本GCシステムにおけるFTの検出限界は4.5pg(S/N=3)である。

3-2. GCシステムおよびその安定性

キャピラリーカラムにはCBP1カラムを用い、検出器にはSIDを用いた。キャリアーガスにはヘリウムを用い流速は1ml/minとし、カラム温度は260℃、注入口温度は290℃および検出器温度は320℃で測定した。

本GCシステムの安定性について、既知量のFTを溶解させた酢酸エチル溶液について3日間にわたり測定し検討したところ、Table 3-1.に示すように日差間の変動はほとんど見られなかった。

Table 3-1. Reproducibility of isotope dilution analysis

Amount added (ng/ml)	Amount found (ng/ml) (n=5)					
	1st day		2nd day		3rd day	
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
0.2	0.201	1.7%	0.210	5.5%	0.197	6.4%
4	4.07	0.6%	4.11	0.6%	4.16	1.3%
40	39.6	0.5%	39.6	0.9%	39.3	0.4%

3-3. 一般的な内部標準法と同位体希釈分析法の比較

重水素標識体であるFT- $^2\text{H}_{19}$ を内部標準に使用するにあたり、FTのプロピオニル基をアセチル基に置換したFT-A、FTのフェニル基をベンジル基に置換したFT-Bを内部標準に使用した場合との比較検討を行った。まず、FT-A、FT-BをFTの内部標準として使用した場合のGCにおける分離について検討した。FT、FT- $^2\text{H}_{19}$ 、FT-A、FT-B各100pgをGCに注入したクロマトグラムをFig.3-1.に示すが、FT-AおよびFT-Bの保持時間はそれぞれ約13分と約12分で両者ともFTのピークと完全に分離している。次に再現性について検討するため既知量のFTを添加した血清について、数段階の抽出操作後GC測定した。結果をTable 3-2.に示すが、FT濃度0.4ng/mlの時FT- $^2\text{H}_{19}$ を用いた場合の相対標準偏差が8.9%と少し大きくなっているが、その他の濃度に関してはFT-AおよびFT-Bのいずれに対しても優れた再現性を示した。これはFT-AおよびFT-Bでは、抽出時の分配、GCの注入棒からの気化およびカラムへの吸着がFTとは大きく異なるためと考えられる。またFT- $^2\text{H}_{19}$ 使用時でも0.4ng/mlでの変動が大きくなる原因は、低濃度ではFTピークがFT- $^2\text{H}_{19}$ ピークのテーリングの影響を受けやすいためと考えられる。

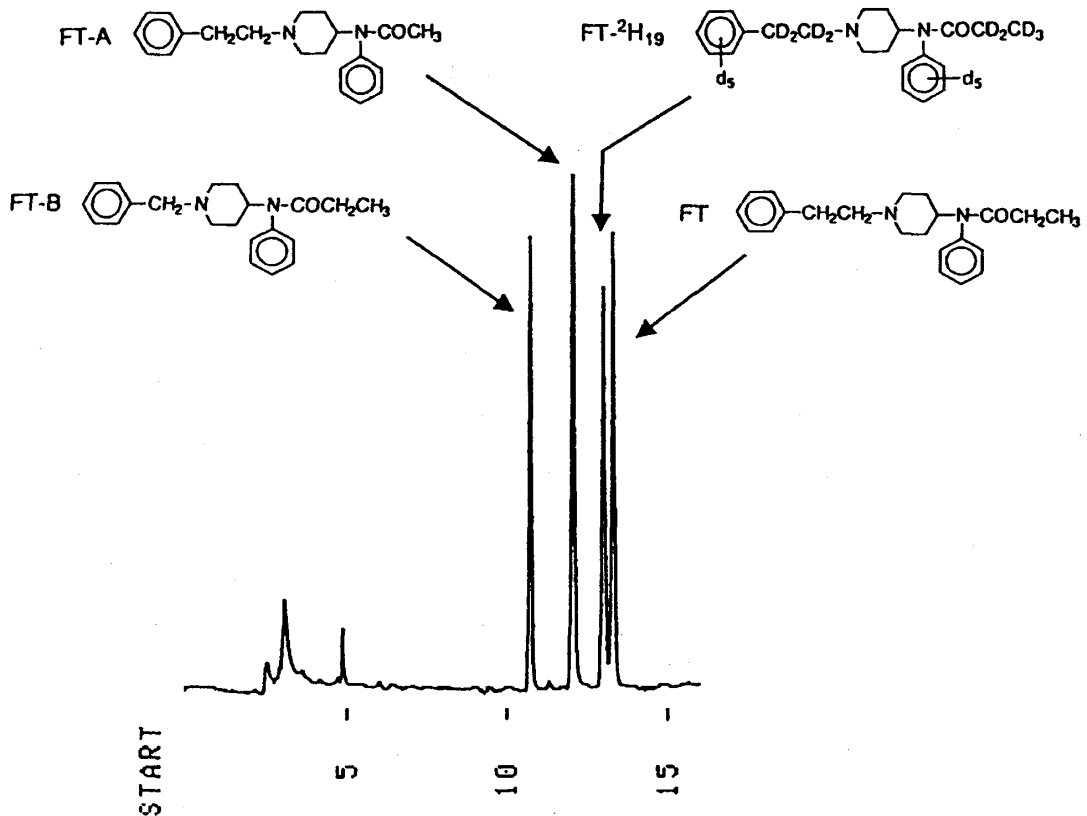


Fig. 3-1. Chromatogram of FT and internal standards, FT-A, FT-B and FT- $^2\text{H}_{19}$.

Table 3-2. Comparison of internal standards, FT-A and FT-B with deuterated analogue, FT-²H₁₉

Amount added (ng/ml)	Amount found (ng/ml) using each internal standard (n=3)					
	FT-A		FT-B		FT- ² H ₁₉	
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
0.4	0.414	4.3%	4.37	269%	0.416	8.9%
4	4.07	22.4%	1.37	25.8%	4.01	3.9%
21	21.1	19.2%	28.6	18.8%	21.3	0.8%

3-4. 血清中FT測定時の直線性と再現性

微量薬物測定時には薬物の容器表面への吸着が問題となる。同位体希釈分析を用いた本測定法の場合、FTとFT-²H₁₉の物理化学的性質が同じため吸着しても自動補正が期待できるが、吸着によるFTの絶対量の減少を予防するため使用するガラス器具は表面をシリル化処理している。また、近年問題となっている血清分離採血管への吸着^{14, 15)}についても、吸着の最も少ないもの¹⁶⁾を選択した。

ヒトコントロール血清を用いFTが0.2-40ng/ml、FT-²H₁₉が20ng/mlとなるように調製しGC測定して得られたピーク面積から、重量比(FT/FT-²H₁₉, x)に対するピーク面積比(FT/FT-²H₁₉, y)の検量線を作成したところ、 $y=1.052x+0.016$ ($r=0.999$)と優れた直線性が認められた。なおこの直線の傾きは、FTとFT-²H₁₉のモル比とほぼ等しい値となっている。今回、検量線の下限は0.2ng/mlに設定しているがFT-²H₁₉添加量を減らすことにより分離性を高めれば、より低濃度での定量が可能である。しかしながら今回の条件では、微量FT測定時における吸着等の影響を考え、キャリアー効果を期待しFT-²H₁₉の添加量をFT定量限界量の100倍に設定している。

FT添加血清試料における再現性をTable 3-3.に示す。同一濃度試料を5個ずつ用意し、抽出後24時間以内に測定した場合、FT 0.2ng/mlで相対標準偏差15%以内、それ以上の濃度では10%以内であった。なおこの結果から算出した添加回収率は0.2ng/mlで110%、40ng/mlで101%であった。また抽出操作におけるFT回収率を算出したところ34%と低いが、キャピラリーカラムの分離能の低下を防ぐため本抽出・精製方法を採用しており、同一のキャピラリーカラムで300サンプル以上の測定が可能である。

3-5. FT投与患者におけるFT血清中濃度の測定

実際にFT投与を受けた患者について、その血清中濃度を本方法により測定した。Fig.3-2.に測定時のクロマトグラムの例を示すが、FTおよびFT-²H₁₉のピークが明瞭に認められ、また併用薬物による妨害もなく、臨床レベルでの応用も可能であることが確認された。さらにFT血清中濃度の時間変化をFig.3-3.に示す。投与後1時間で1ng/ml以下になる例もあるものの、本方法により測定できることが確認され、FTの動態解析に十分応用できるものと考えられる。

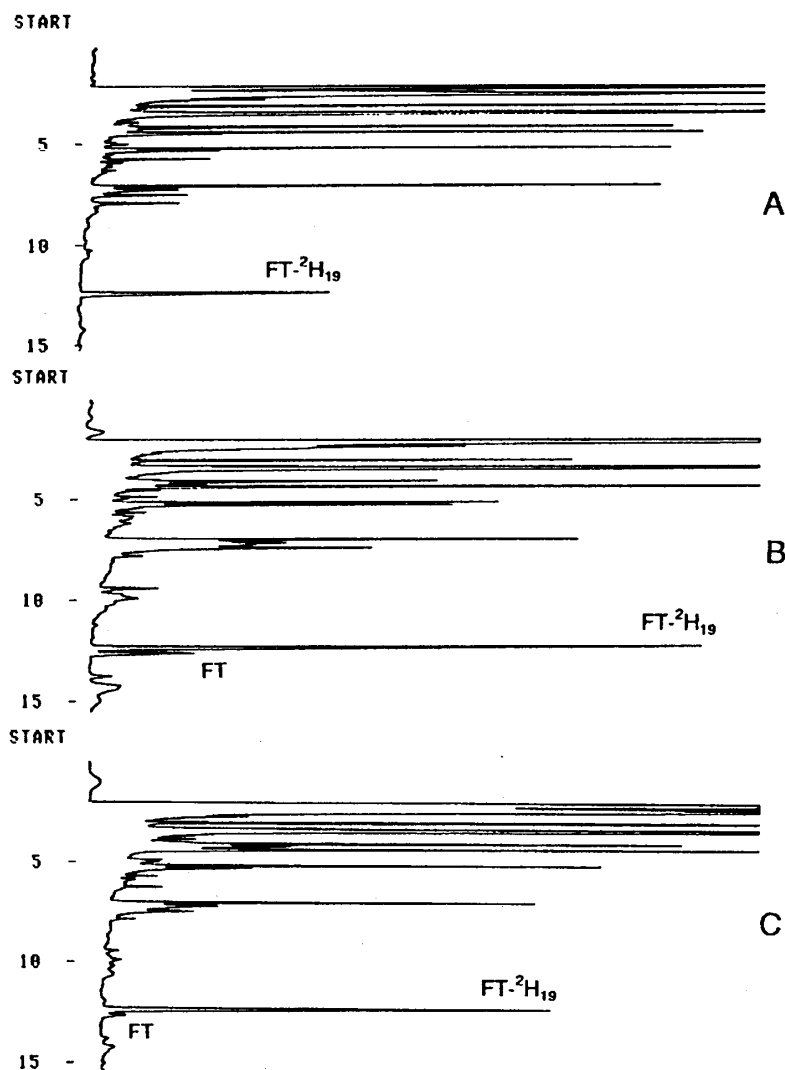


Fig. 3-2. Chromatograms of serum extracts from patient using the deuterated analogue FT-²H₁₉ as an internal standard. Collection time of serum after the administration of FT (5 μg/kg i.v.): Control (A), 20 min, FT 2.13 ng/ml (B) and 90 min, FT 0.46 ng/ml (C).

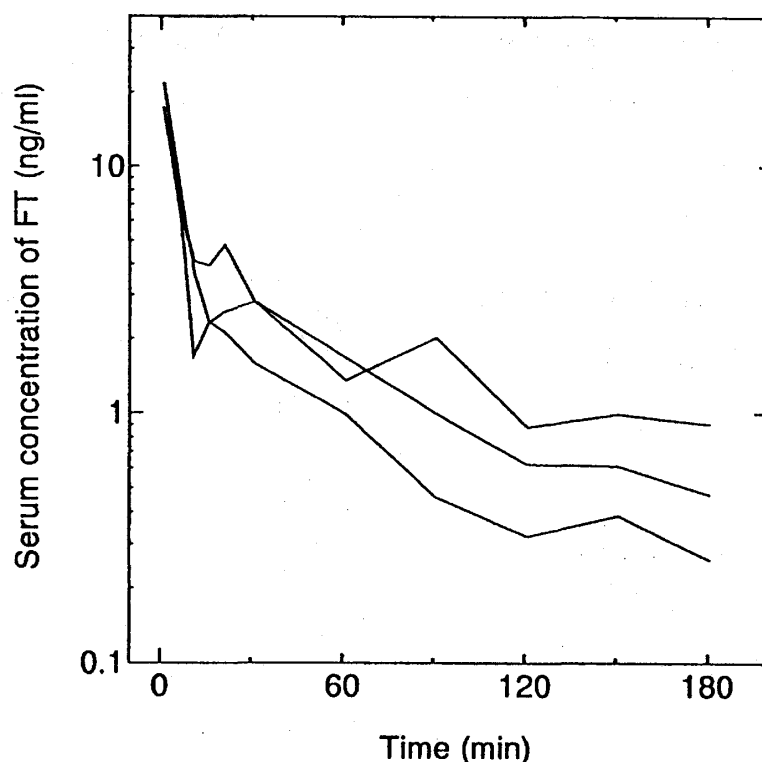


Fig. 3-3. Serum concentration versus time profile for FT in patients after administration of FT (5 µg/kg i.v.).

4. 同位体希釈分析法による尿中フェンタニルおよびその代謝物の定量

4-1. 同位体分離法によるFT代謝物の測定

GoromaruらはGC-MSを用いた安定同位体トレーサ法によりFTの代謝研究を行い、ラット尿代謝物として5種を検出し¹⁷⁾、FT投与患者尿中にその中の3種が排泄されることを確認している¹⁸⁾ (Fig.4-1.)。また、ラットならびにモルモットの遊離肝細胞を用いた代謝実験によりFTのフェネチル基の水酸化体数種を検出し¹⁹⁾、FT大量投与患者尿中の未変化FT、主代謝物である脱フェネチル体 (Nor-FT)、およびFTのp位の水酸化体の定量を行っている²⁰⁾。

このようにGC-MSによる安定同位体トレーサ法は、化学構造を反映した情報が得られ、またSelected Ion Monitoringによる高感度定量が可能などの利点を有しているが、高度の技術と特殊な機器を必要とする等の理由から一般に普及していない。最近、MSを用いない新しい安定同位体測定法として、キャピラリーGCによる安定同位体希釈分析法がいくつかの薬物に応用されている²¹⁻²⁴⁾。FTについても重水素標識体による同位体分離測定が可能であることはすでに述べた通りである^{25, 26)}。そこで同位体希釈分析法を尿中FT定量に応用し、さらに尿中Nor-FTの定量についても検討した。

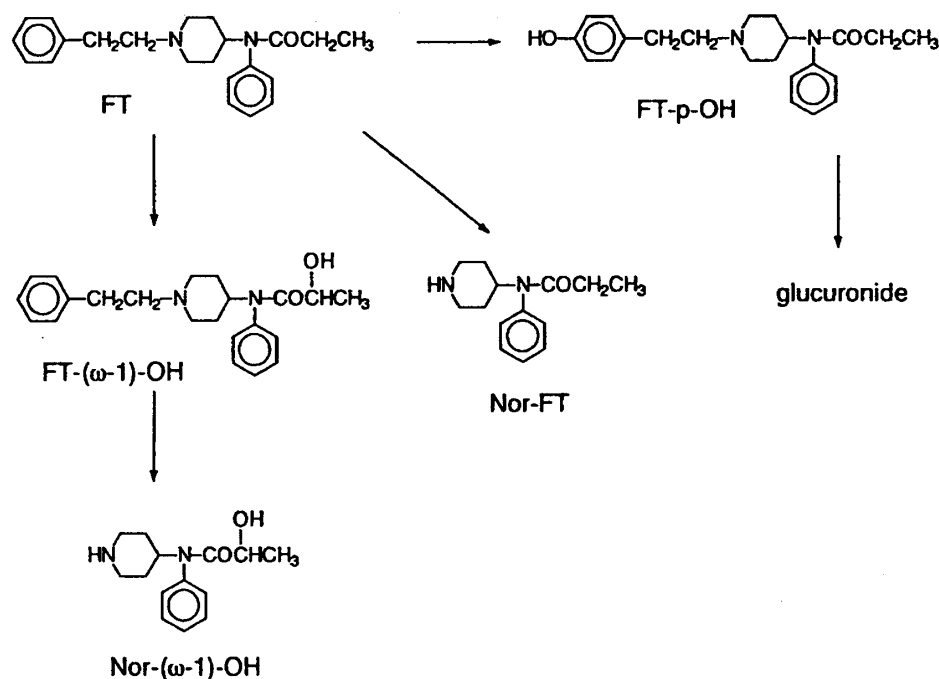


Fig. 4-1. Metabolic pathway of FT.

4-2. 尿中FT測定時の直線性および再現性

血清中FT濃度測定法がFTの尿中濃度測定に応用可能であるか検討した。コントロール尿1mlにFT 0.4-40ngおよびFT-²H₁₉ 20ngを添加し、FT血清抽出法と同様に抽出後GC測定し重量比(F_T/FT-²H₁₉, x)とピーク面積比(F_T/FT-²H₁₉, y)の検量線を作成したところ、 $y=1.022x+0.027$ ($r=1.000$)と優れた直線性が得られた。なおこの場合も直線の傾きはモル比とほぼ同じ値である。さらに再現性について検討したところTable 4-1.に示すように、0.4ng/mlの場合に相対標準偏差が16.7%と大きくなっているもののそれ以上の濃度では3%程度と優れた再現性を示した。またこの結果から算出した添加回収率は0.4ng/mlで116%、42 ng/mlで101%であった。

Table 4-1. Reproducibility of FT concentration in urine

Amount added (ng/ml)	Amount found (ng/ml)					Mean	RSD
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5		
0.4	0.481	0.372	0.592	0.512	0.454	0.482	16.7%
4	3.89	3.50	3.68	3.67	3.68	3.68	3.7%
42	42.4	40.2	43.4	43.1	41.9	42.2	3.0%

4-3. FT主代謝物 (Nor-FT) の高感度検出と同位体分離条件

FTの主代謝物であるNor-FTの尿中排泄量の測定を試みた。血清中FTの高感度測定はSIDの3級アミン特異性によるものであるが、FTの主代謝物であるNor-FTは脱フェネチル化を受けて2級アミンとなっており、そのままでは高感度検出は期待できない。そこでN-アルキル誘導体化により3級アミンとし、尿中Nor-FTの高感度検出を試みた。

3種類のN-アルキル誘導体 (Fig.4-2.)、Nor-FT-Me、Nor-FT-EtおよびNor-FT-Benについてその検出感度を比較検討した。Nor-FT-Me、Nor-FT-Et、Nor-FT-BenおよびFT標品各2ngをSID装備キャピラリーGCにカラム温度260℃で同時注入し、FTに対する相対感度を測定した。その結果Nor-FT-Me、Nor-FT-EtおよびNor-FT-Benの相対感度はそれぞれ2.12、1.68、0.59とメチルおよびエチル誘導体では相対感度が増加することが確認された。Suzukiら^{1,2)}はFTのいくつかの部位にメチル基を導入した場合、その電子供与性が表面電離化を容易にしSID感度が増加することを報告しており、今回の結果も同様の理由によるものと考えられる。

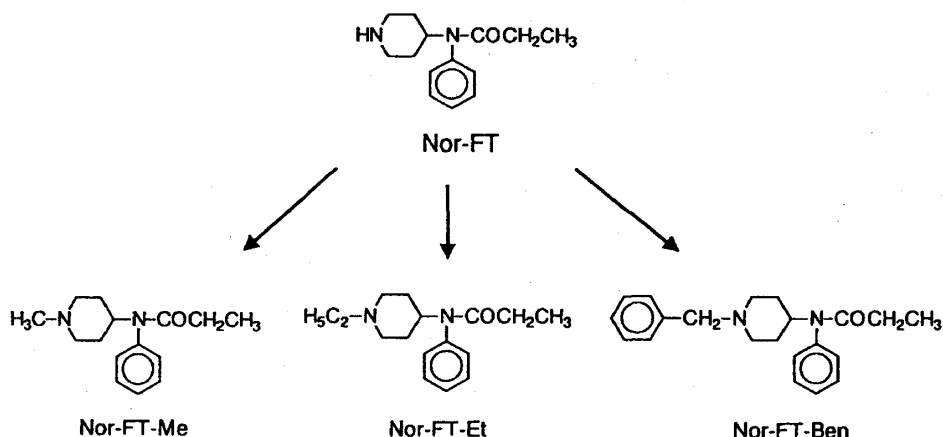


Fig. 4-2. Derivatization of Nor-FT.

次にNor-FT各誘導体とその重水素標識体のキャピラリーGCによる分離条件について検討した。カラム温度160-260℃または220-270℃における各誘導体とその重水素標識体のクロマトグラムをFig.4-3.に示すが、いずれの場合も非標識体より重水素標識体の保持時間の方が短い。またカラム絶対温度の逆数と分離度Rsの間にはFig.4-4.に示すように直線関係が認められ、カラム温度が低いほど保持時間は長くなるが、分離が良くなることが確認された。また測定時間30分以内で、同位体分離が可能であるRs値1以上が得られるカラム温度は、Nor-FT-Meでは170-180℃、Nor-FT-Etでは170-210℃、Nor-FT-Benでは230-250℃であることが判明した。

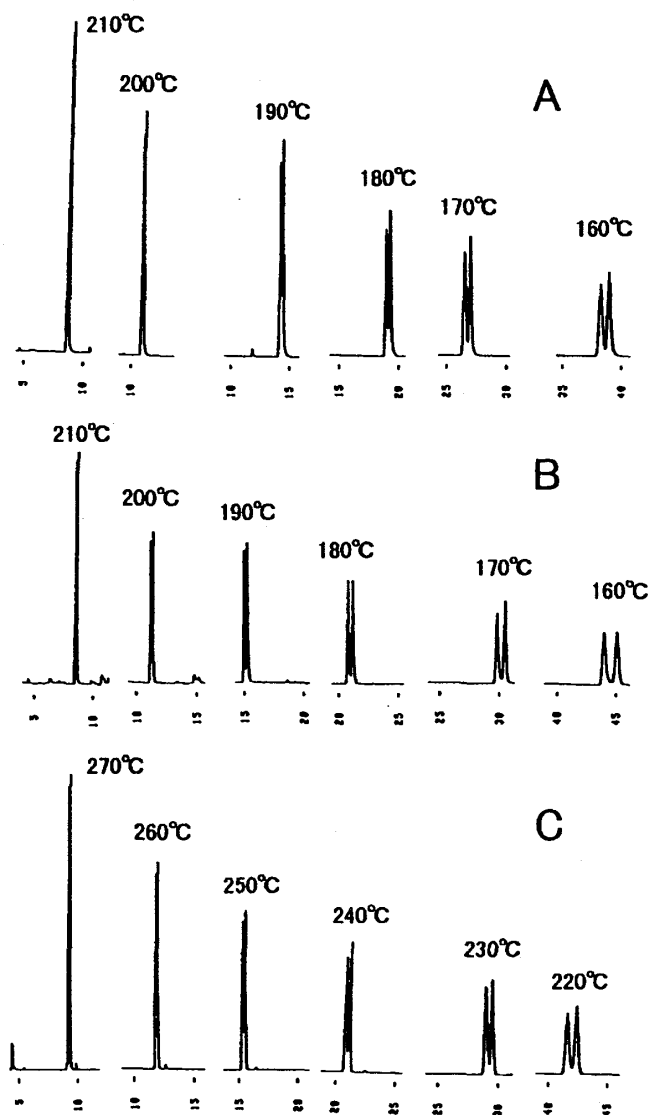


Fig. 4-3. Chromatograms of Nor-FT derivatives and their deuterated analogues Nor-FT-Me (A), Nor-FT-Et (B) and Nor-FT-Ben (C).

これらの結果から、比較的感度の高いメチルおよびエチル誘導体を用い上記のカラム温度でNor-FT添加尿の抽出・GC測定を行ったところエチル誘導体については尿中物質の妨害を受け正確な測定ができなかった。そこで検出感度、分離性、尿中物質による妨害の点を考慮し、メチル誘導体化により尿中Nor-FTの高感度検出を行うこととした。なお、Nor-FT誘導体化時にFTのNor-FTへの分解が起こりNor-FT濃度が増加する現象が確認されたが、その生成量はFT量に関係なく25%程度と一定であることから得られたFT濃度をもとにNor-FT濃度を補正することとした。

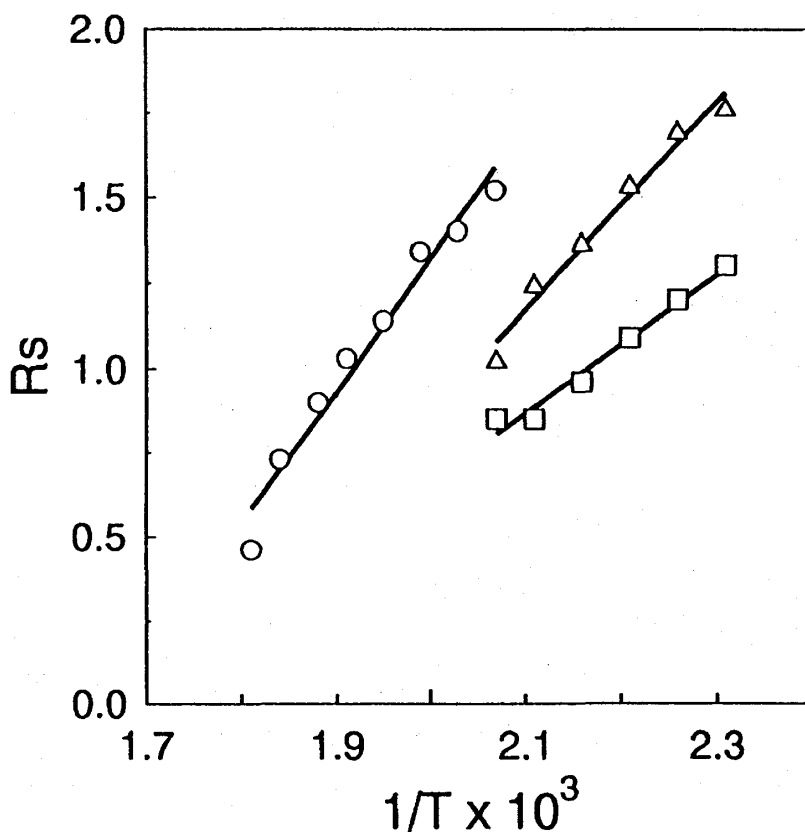


Fig. 4-4. Effect of column temperature (T in Kelvin) on the separation of Nor-FT derivatives and their deuterated analogues. Nor-FT-Me (\square), Nor-FT-Et (\triangle), Nor-FT-Ben (\circ)

4-4. 尿中Nor-FT測定時の直線性と再現性

コントロール尿1mlにNor-FT 10-400ng、Nor-FT- $^2\text{H}_{10}$ 200ngを添加し検量線を作成したところ、 $y=1.372x-0.044$ ($r=0.999$)と優れた直線性が得られた。直線の傾きが1より大きくなっているが、今回の測定条件であるカラム温度ではNor-FT-MeとNor-FT- $^2\text{H}_{10}$ -Meの分離が完全ではなく、重水素標識体ピークのテーリングによる影響を受けるたと考えられる。なおこの誘導体調製条件でのメチル化率は61%であり、またNor-FT測定GC条件でのNor-FT-Me検出限界は1.7pg(S/N=3)であった。

各濃度につき5個のサンプルを用意し、抽出操作後GC測定することにより日内の再現性について検討したところ、Table 4-2.に示すように10ng/mlの場合で相対標準偏差4%と再現性よく測定できた。またこの結果から算出した添加回収率は10ng/mlで123%、399ng/mlで101%であった。

Table 4-2. Reproducibility of Nor-FT concentration in urine

Amount added (ng/ml)	Amount found (ng/ml)					Mean	RSD
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5		
10	12.85	12.15	12.72	11.75	11.93	12.28	4.0%
40	37.26	45.40	36.15	42.72	45.23	41.35	10.6%
399	371.3	419.1	429.8	393.5	407.4	404.2	5.6%

4-6. FT投与患者における尿中FTおよびNor-FT濃度の測定

実際にFT投与患者尿中のFTおよびNor-FTの定量を行ったクロマトグラムの例をFig.4-5.に示すが、FTおよびNor-FTのピークが明瞭に認められ、併用薬物による妨害は認められない。また測定結果をTable 4-3.に示すが、本方法によるFTおよびNor-FTの尿中濃度測定は、臨床レベルにおいても十分応用可能であることが確認された。

最近諸外国では陶酔作用を目的としたFTの乱用が問題となっており²⁷⁻³⁰⁾、本方法による尿中FTおよびNor-FTの測定はそのスクリーニングにも十分利用可能であると思われる。

Table 4-3. Urinary concentration of FT and Nor-FT

Time (min)	Subject A			Subject B		
	FT (ng/ml)	Nor-FT (ng/ml)		FT (ng/ml)	Nor-FT (ng/ml)	
		Measured	Corrected		Measured	Corrected
0-60	0.37	0.0	0.0	1.54	10.3	10.1
60-120	8.03	84.1	82.7	1.81	46.3	45.9
120-180	4.97	86.6	85.7	1.75	50.5	50.2
180-240	2.49	63.7	63.2	0.36	39.5	39.4
240-360	0.59	52.8	52.7	0.59	20.8	20.7
360-480	1.74	71.1	70.8	1.61	51.1	50.8

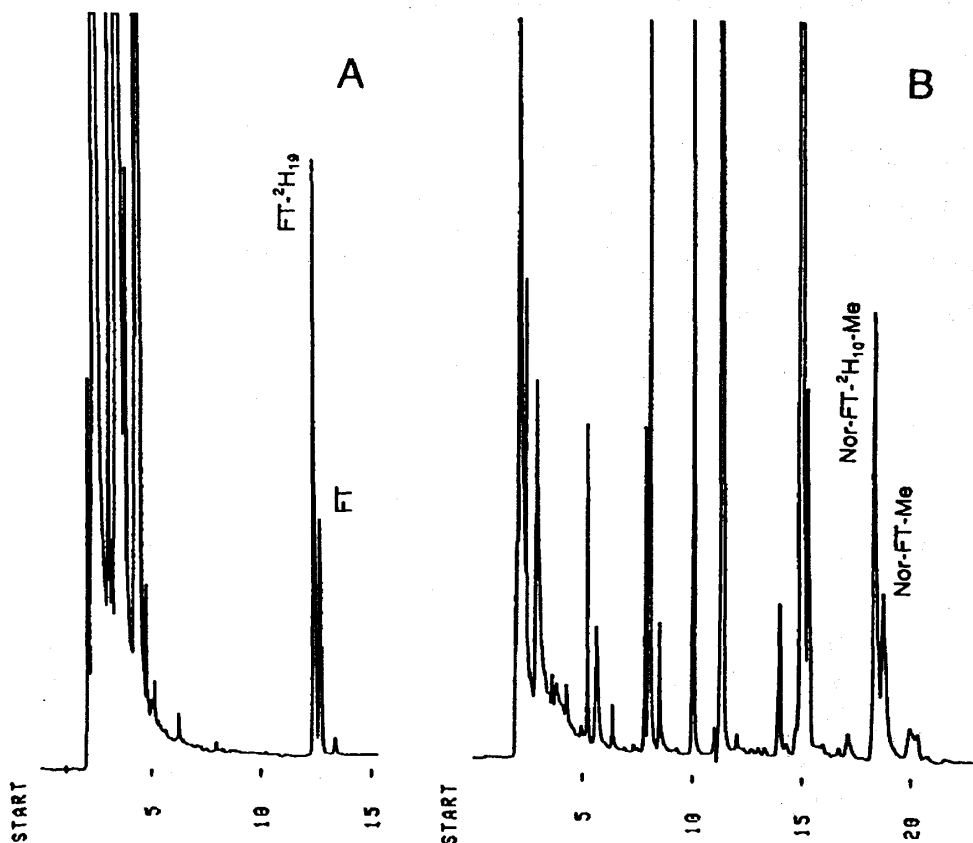


Fig. 4-5. Chromatograms of urine extracts from patients using the deuterated analogue FT-²H₁₉ (A) or Nor-FT-²H₁₀ (B) as the internal standard. Collection time of urine after the administration of FT (5 μg/kg i.v.): 60 min, FT 7.27 ng/ml (A) and 480 min, Nor-FT 71.14 ng/ml (B).

5. 同位体希釈分析法の応用

5-1. FTの体内動態解析

FTの作用機序はモルヒネと同様で吐き気、嘔吐、呼吸抑制等の副作用があるが^{31, 32)}、鎮痛効果が高く作用の立ち上がり早いこと、また安全域も広いことから外科手術時の鎮痛薬として繁用されている。FTの作用は血中濃度に対応するとされているが、体内からの消失は速やかなため長時間の手術では作用を持続させることが困難である等の問題を有している。

これまでにキャピラリーGCを用いた同位体希釈分析法により、血清中および尿中のFT濃度ならびに主代謝物であるNor-FTの尿中濃度の定量が可能であることを確認した³³⁾。そこで複数の患者について血清中・尿中FTおよび尿中Nor-FTを測定し、FTの患者における

血中濃度推移や尿中排泄の実態を把握すると共に、得られたデータを基にFTの体内動態の解析を試みた。

5-2. FT投与患者における血清中濃度の時間変化

外科手術を受けた17名の患者について得られたFTの血清中濃度の時間変化をFig.5-1.に示す。各患者におけるFTの血清中濃度には著しい相違があり180分値で10倍以上の差が認められ、患者による個体差が大きいことが分かる。患者によってはFT濃度が上昇する場合が認められるが、既に報告されている^{3,4)}ように運動による筋肉から血液へのFTの移行が原因とも考えられる。

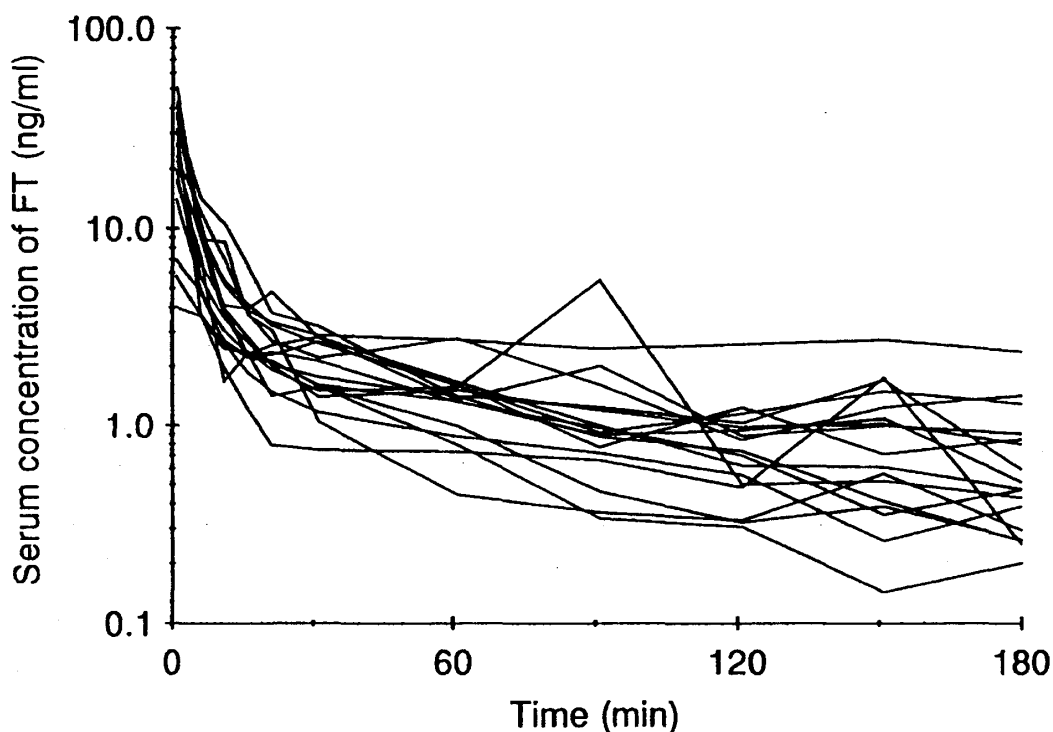


Fig. 5-1. Serum concentration versus time profile for FT in patients after administration of FT (5 μ g/kg i.v.).

5-3. FT投与患者におけるFT尿中排泄量の時間変化

一方、尿の採取は手術終了後も採尿バッグを交換することで可能であるので、患者がICUへ移された後も継続して行い手術開始後480分まで実施した。FTの尿中排泄量は血清中濃度の個人差を反映してFig.5-2.に示すように大きな相違が認められる。血清中濃度が最も高く持続した患者では尿中排泄量も投与量の10%を越える最も大きな値となっている。また、同

様にNor-FTの尿中排泄量にもFig.5-3.に示すような個人差が認められる。FTおよびNor-FTの尿中排泄量には明確な関係は認められない。

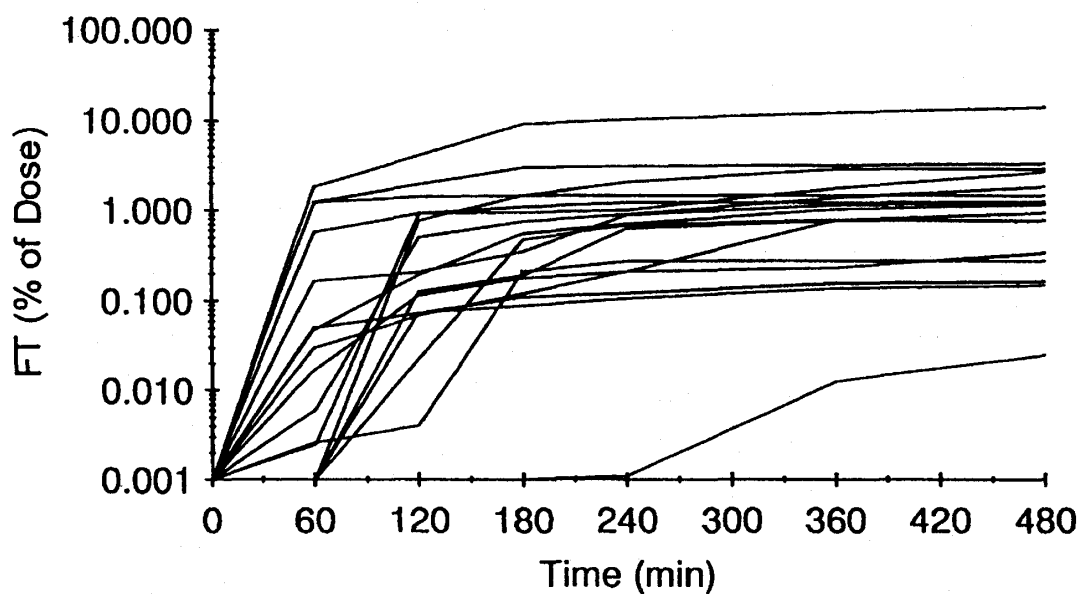


Fig. 5-2. Cumulative excretion amount versus time profile for FT in urine from patients after administration of FT ($5\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.).

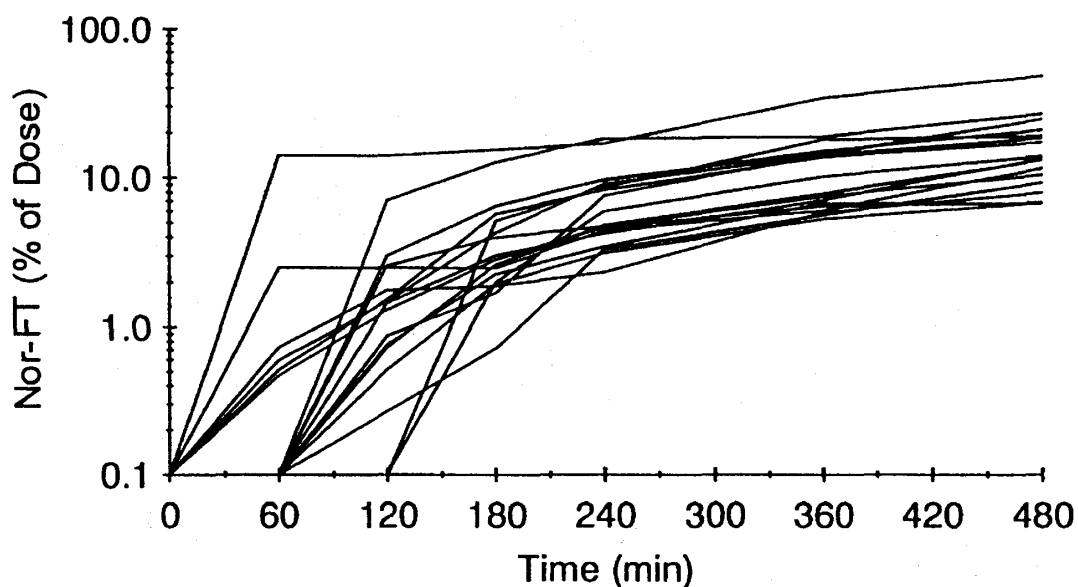


Fig. 5-3. Cumulative excretion amount versus time profile for Nor-FT in urine from patients after administration of FT ($5\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.).

5-4. FT体内動態のコンパートメントモデル解析

FTの代謝に関しては動物実験ではNor-FTが主代謝物であるとするもの^{17, 35)}や脱プロピオニル体が主代謝物であるという報告³⁶⁾があるが、ヒトにおいてはNor-FTが主代謝物であると報告されている^{18, 37)}。またGoromaruらは、Fig.4-1.に示すようにFTはNor-FTとp位の水酸化を受けたFT-p-OH、さらにプロピオニル基の ω -1位が水酸化を受けたFT-(ω -1)-OHとなり、これがさらに脱フェネチル化を受けてNor-(ω -1)-OHとなることを報告している²⁰⁾。そこでモデルとしては、代謝過程にNor-FTとFT-p-OHを含むその他の代謝物を想定し、生成したNor-FTはさらに代謝を受けることなく尿中に全てが排泄されるとした (Fig.5-4.)。なお、このモデルでは中央コンパートメントに存在するFTの量をA、末梢コンパートメントに存在するFTの量をB、尿中に排泄されたFTの累積排泄量をU、FTから生成したNor-FTの体内量をC、FTから生成した他の代謝物の量をE、尿中に排泄されたNor-FTの累積排泄量をMとした。また中央コンパートメントから末梢コンパートメントへの速度定数を k_{12} 、末梢から中央への逆方向の速度定数を k_{21} 、FTの尿への排泄速度定数を k_{10} 、代謝によるFTの消失速度定数を km およびそのNor-FTの占める割合を Fe 、Nor-FTの尿への排泄速度定数を ku 、FTおよびNor-FTの尿中排泄に関するラグタイムを $T1$ 、 $T2$ とした。

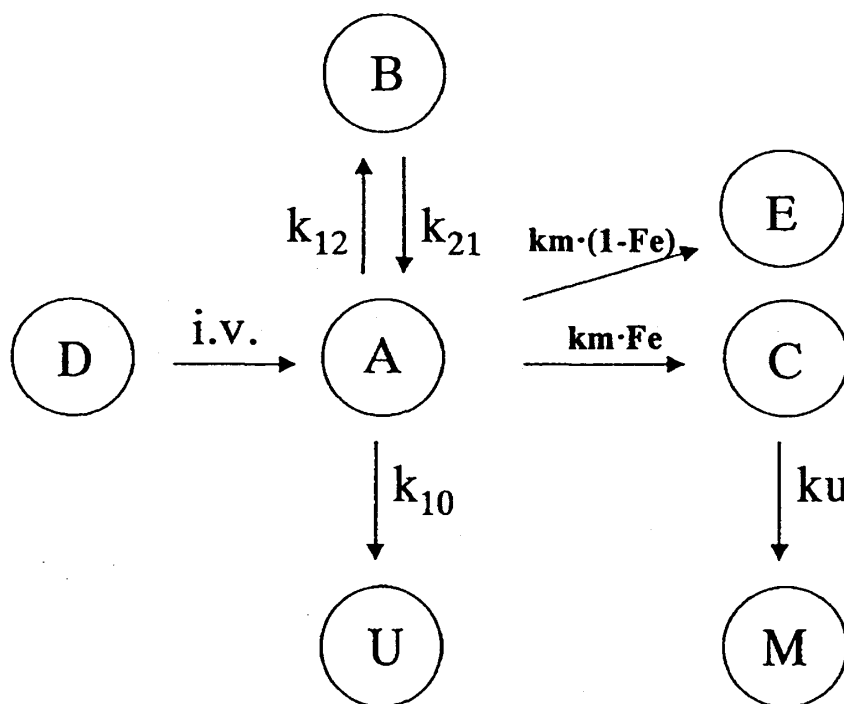


Fig. 5-4. Two-compartment model build into metabolic process.

血清中FT濃度、FTおよびNor-FT尿中排泄量の時間変化をもとに代謝過程を含むモデルを用いた解析によって各患者のパラメータを求めた。測定値と得られたパラメータによる推定値の例をFig. 5-5.に示すが、FTの動態はこのモデルによく適合していることが確認された。各パラメータの平均値および標準偏差をTable 5-1.に示すが、患者間で著しい相違が認められる。これは個々の症例により手術内容、麻酔時間、輸液量など、FTの消失に影響を与える要因が大きく異なるためと考えられる。そこで個々の症例における年齢、身長、体重、肥満度指数(BMI)、出血量および輸液量と各パラメータとの相関について検討したところ、出血量とクリアランスの間に $r=0.73$ の相関が認められた。これは出血によるFTの体外への移行を反映するもので当然と考えられるが、その他とは有意な相関は認められなかった。また、これまでの報告されたパラメータとの比較をTable 5-2.に示す。表中の k_{10} 値は血中からのFTの消失速度定数であり、今回のモデルでは k_{10} と k_m との和に相当する。各パラメータの値はこれまでの報告³⁸⁻⁴¹⁾と比較して大きな違いは認められない。

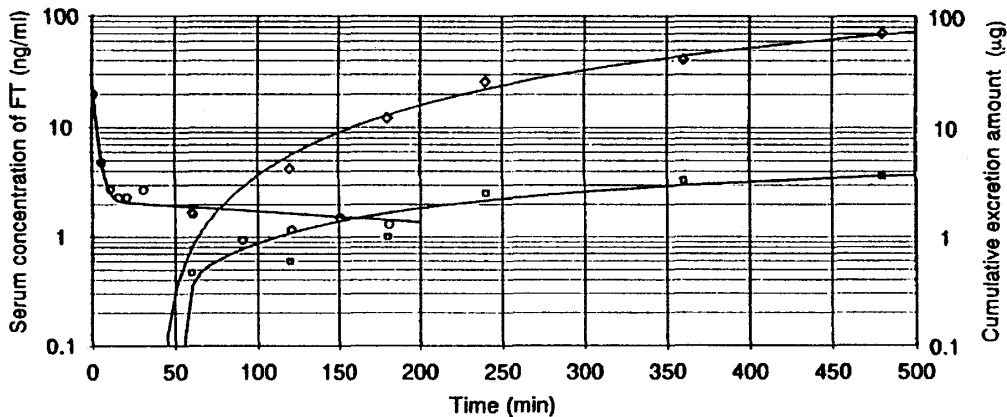


Fig. 5-5. Time course of FT and Nor-FT.

- :Serum concentration of FT (ng/ml)
- :Cumulative excretion amount of FT in urine (μg)
- ◇:Cumulative excretion amount of Nor-FT in urine (μg, conversion value to FT)
- :Predicted curve by two-compartment model

今回測定した症例についても投与後6時間までのNor-FTの排泄率(% of Dose)は7.1-50.2% (平均17.2%) と、FTの排泄率0.03-3.48% (平均1.19%) に比べて大きい。少数例ではあるがGoromaruらは、FTを0.5mg/body および2-3mg/body投与を受けた患者の24時間尿中には未変化FTがいずれも1-4%、Nor-FTは30-55%および8-25%排泄されることをGC-MSにより確認している²⁰⁾。また、今回推定した最終排泄率はFTで0.14-15.77% (平均4.30%)、Nor-FTでは7.36-99.38% (平均55.12%) であり、FTの消失過程においてNor-FT生成の占める割合が大きいことを示している。

以上のように、FTおよびNor-FTの体内動態は代謝過程を含む2-コンパートメントモデ

Table 5-1. Pharmacokinetic parameters of FT in patients

Parameter	Mean	SD	RSD(%)
α (min ⁻¹)	0.338	0.294	87.2
β (min ⁻¹)	0.0119	0.0187	156.8
k_{10} (min ⁻¹)	0.00159	0.00231	145.1
k_{21} (min ⁻¹)	0.0496	0.0659	133.0
k_u (min ⁻¹)	0.00545	0.00546	100.2
k_{12} (min ⁻¹)	0.221	0.193	87.3
k_m (min ⁻¹)	0.0776	0.0893	115.1
Vc (l/kg)	0.276	0.304	110.5
Fe	0.569	0.415	72.9
T1 (min)	63.6	42.4	66.7
T2 (min)	63.6	40.1	63.1
AUC (mg/l·min)	859	1024	119.3
CL (l/kg/min)	0.0120	0.0097	81.2
MRT (min)	533	993	186.3
Vdss (l/kg)	2.41	2.58	107.2

Table 5-2. Pharmacokinetic parameters of FT in previous reports

Parameter	Ishii ³⁸⁾	Hengstmann ³⁹⁾	Haberer ⁴⁰⁾	Bower ⁴¹⁾	Current study
	GC-TSD	RIA	RIA	RIA	GC-SID
Vc (l/kg)	0.745	0.0707	0.770	0.882	0.276
CL (l/kg/min)	0.0156	0.00688	0.0108	0.0221	0.0120
k_{10} (min ⁻¹)	0.00210	0.100	0.0115	0.0282	0.0792*
k_{12} (min ⁻¹)	0.0980	0.366	0.0505	0.103	0.221
k_{21} (min ⁻¹)	0.0450	0.0300	0.0177	0.0224	0.0496

* $k_{10} + k_m$

ルに適合し、FTの消失はNor-FT生成によるところが大きいことも確認された⁴²⁾。FTのNor-FTへの代謝はCYP3A4によることがin vitroにおいて確認されており⁴³⁻⁴⁶⁾、CYP3A4活性とNor-FT排泄との間に何らかの相関が得られれば、FTの体内動態を予測する上で重要な情報になると考えられる。

6. おわりに

以上のようにFTのキャピラリーGCによる同位体分離法は、同位体希釈分析に十分利用可能であり臨床応用も可能であることを実証した。将来的にはより高分離能カラムの一般利用が可能になることは確実であり、同位体分離に必要な標識数も少数でよく、また測定も短時間でできるようになることを期待され、本方法はさらに発展する可能性を持つものと考えられる。

REFERENCES

- 1) 世良庄司、池田晴美、五郎丸毅、福山大学薬学年報, **13**, 1-15(1995)
- 2) W.J.Vandenheuvel, J.Lsmith and J.S.Cohen, *J.Chromatogr.*, **50**, 405-412 (1970)
- 3) A.Liberti, G.P.Cartoni and F.Bruner, *J.Chromatogr.*, **12**, 8-14 (1963)
- 4) M.Michiels, R.Hendriks and J.Heykants, *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, **12**, 153-158 (1977)
- 5) R.J.Woestenborghs, D.R.Stanski, J.C.Scott and J.J.Heykants, *Anesthesiology*, **67**, 85-90 (1987)
- 6) B.Fryirsa, A.Woodhouse, J.L.Huang, M.Dawson and L.E.Mather, *J.Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **688**, 79-85 (1997)
- 7) R.Bansal and J.V.Aranda, *J.Liq.Chromatogr.*, **18**, 339-348 (1995)
- 8) K.Kumar, J.A.Ballantyne and A.B.Baker, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, **14**, 667-673 (1996)
- 9) J.A.Phipps, M.A.Sabourin, W.Buckingham and L.Strunin, *J.Chromatogr.*, **272**, 392-395 (1983)
- 10) P.Kintz, P.Mangin, A.A.Lugnier and A.J.Chaumont, *J.Chromatogr.*, **489**, 459-461 (1989)
- 11) T.Fujii and H.Arimoto, *Anal.Chem.*, **57**, 2625-2628 (1985)
- 12) S.Suzuki, H.Tsuchihashi and H.Arimoto, *J.Chromatogr.*, **475**, 400-403 (1989)
- 13) H.Seno, H.Hattori, S.Kurono, T.Yamada, T.Kumazawa, A.Ishii and O.Suzuki, *J.Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **673**, 189-195 (1995)
- 14) A.Dasgupta, R.Dean, S.Saldana, G.Kinnaman and R.W.McLawhon, *Am.J.Clin.Pathol.*, **101**, 456-461 (1994)

- 15) A. Dasgupta, W. Blackwell and D. Bard, *Ther. Drug Monit.*, **101**, 306–309 (1996)
- 16) 坂本伸哉、坂本裕一郎、河野淳子、上原正信, 日本臨床, **53**, 938–941 (1995)
- 17) T. Goromaru, H. Matsuura, T. Furuta, S. Baba, N. Yoshimura, T. Miyawaki and T. Sameshima, *Drug Metab. Dispos.*, **10**, 542–546 (1982)
- 18) T. Goromaru, H. Matsuura, N. Yoshimura, T. Miyawaki, T. Sameshima, J. Miyao, T. Furuta and S. Baba, *Anesthesiology*, **61**, 73–77 (1984)
- 19) T. Goromaru, M. Katashima, H. Matsuura and N. Yoshimura, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3922–3928 (1985)
- 20) 五郎丸毅、川内隆史、片島正貴、松浦博、吉村望、鮫島照子、宮脇武徳, 麻酔, **35**, 35–39 (1986)
- 21) D. J. Hoffman and W. R. Porter, *J. Chromatogr.*, **276**, 301–309 (1983)
- 22) T. Goromaru and H. Maeda, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1635–1639 (1994)
- 23) 五郎丸毅、池尻久恵、橋本謙二、松木洋子, 薬雑, **111**, 612–616 (1991)
- 24) 五郎丸毅、前田晴美、松木洋子、際田弘志, *Radioisotopes*, **42**, 511–516 (1993)
- 25) S. Sera and T. Goromaru, *Radioisotopes*, **46**, 885–892 (1997)
- 26) S. Sera, T. Goromaru, T. Sameshima, K. Kawasaki and T. Oda, *Radioisotopes*, **47**, 480–487 (1998)
- 27) J. H. Silverstein, M. F. Rieders, M. McMullin, S. Schulman and K. Zahl, *Anesth. Analg.*, **76**, 618–621 (1993)
- 28) J. G. Schwartz, J. C. Garriott, J. S. Somerset, E. J. Iglar, R. Rodriguez and M. D. Orr, *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, **15**, 236–241 (1994)
- 29) G. S. Makowski, J. J. Richter, R. E. Moore, R. Eisma, D. Ostheimer, M. Onoroski and A. H. Wu, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **25**, 169–178 (1995)
- 30) D. A. Jerrard, *J. Emerg. Med.*, **8**, 733–741 (1990)
- 31) G. L. Henderson, *J. Forensic Sci.*, **33**, 569–575 (1988)
- 32) J. Scholz, M. Steinfath and M. Schulz, *Clin. Pharmacokinet*, **31**, 275–292 (1996)
- 33) S. Sera, T. Goromaru, T. Sameshima, K. Kawasaki and T. Oda, *Radioisotopes*, **47**, 537–545 (1998)
- 34) R. J. Hudson, I. R. Thomson, J. E. Cannon, R. M. Friesen and R. C. Meatherall, *Anesthesiology*, **64**, 334–338 (1986)
- 35) I. Van Wijngaarden and W. Soudijn, *Life Sci.*, **7**, 1239–1244 (1968)
- 36) Y. Maruyama and E. Hosoya, *Keio J. Med.*, **18**, 59–70 (1969)
- 37) H. H. Van Rooy, M. P. Vermeulen and J. G. Bovill, *J. Chromatogr.*, **223**, 85–93 (1981)

- 38) 石井孝弘、森山享、上能伊公雄, 麻醉, **40**, 960-964 (1991)
- 39) J.H.Hengstmann, H.Stoeckel and J.Schuttler, *Br.J.Anaesth.*, **52**, 1021-1025 (1980)
- 40) J.P.Haberer, P.Schoeffler, E.Couderc and P.Duvaldestin, *Br.J.Anaesth.*, **54**, 1267-1270 (1982)
- 41) S.Bower and C.J.Hull, *Br.J.Anaesth.*, **54**, 871-877 (1982)
- 42) S.Sera, T.Goromaru, T.Sameshima, K.Kawasaki, T.Oda and N.Yoshimura, *J.Anesth.*, submitted
- 43) D.E.Feierman and J.M.Lasker, *Drug Metab.Dispos.*, **24**, 932-939 (1996)
- 44) T.Tateishi, Y.Krivoruk, Y.F.Ueng, A.J.Wood, F.P.Guengerich and M.Wood, *Anesth.Analg.*, **82**, 167-172 (1996)
- 45) R.B.Labroo, M.F.Paine, K.E.Thummel and E.D.Kharasch, *Drug Metab.Dispos.*, **25**, 1072-1080 (1997)
- 46) J.Guitton, T.Buronfosse, M.Desage, A.Lepape, J.L.Brazier and P.Beaune, *Biochem.Pharmacol.*, **53**, 1613-1619 (1997)