

第15回 日本臨床薬理学会 1994年12月1～2日 アクトシティ浜松

固相による抽出・濃縮とRIAを組み合わせた 血漿中 ddC 濃度測定方法

中野真子^{*1,*2} Helen Kastrissios^{*1}
Terrence F. Blaschke^{*1} 中島光好^{*2}

はじめに

ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬は現在日本および米国で臨床使用が認可されている唯一の抗HIV薬グループであり、日本では2剤、米国では4剤が認可されている。開発中の多くの抗HIV薬もヌクレオシド系抗HIV薬と併用して用いられることが多い。

米国FDAにより3番目に認可された抗HIV薬 zalcitabine (2',3'-dideoxycytidine, ddC) はピリミジン誘導体であり、DNAを構成している2'-deoxycytidineのリボース3'の位置の-OH基が-Hに置き換えられたものである。細胞内の一連のシチジンリン酸化酵素によりリン酸化された三リン酸化体が、HIV逆転写酵素の活性部位で2'-deoxycytidine三リン酸と競合し、またウイルスDNAに取り込まれたddC三リン酸は chain terminatorとしてウイルスDNAの合成を止める¹⁾。

ddCは効力が他のヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬よりも強く²⁾、投与量がZDVやddIの100分の1以下で、血漿中濃度も低い (ddC一般投与量0.75 mg投与後、 C_{max} は約10 ng/ml。ZDV 200 mgでは C_{max} が約1000 ng/ml)。そのため、HPLCやRIAなどの通常の測定方法 (測定限界3-50 ng/ml^{3),4)} ではせいぜい C_{max} 前後しかとらえられない。HPLC-MS法では0.25 ng/mlまで測定できる⁵⁾

が、特殊な操作や機器が必要であり、費用がかかるため、多数の検体の測定には不適當である。

目的

簡便で臨床应用到した血漿中ddC濃度測定方法を確立すること。

方法

メタノール1 ml及び水2 mlでコンディショニングした C_{18} 固相カラム (Sep-Pak, Waters) に、検体血漿1 ml (または0.5 ml) を通した後、水1 mlで洗浄した。続いて、メタノール2 mlにて溶出し、溶出液をSpeedVacにて乾固した後、バッファ100 μ lで再溶解したものをRIAに導入した。RIAは市販キット (Sigma) の手順通りに行なわれた⁶⁾。固相回収率は³H-ddCを血漿に添加し、上の操作により溶出した液のシンチレーションカウントを同量の³H-ddCのシンチレーションカウントと比較して求めた。この固相抽出とRIAを組み合わせた方法を利用して、抗HIV薬の併用療法比較試験に参加している患者より採血した検体 (約300) の血漿中ddC濃度を測定した。ddC投与量は0.75 mg (8時間ごと) であった。

結果

各測定日の検量線 (0.3-20 ng/ml) は統計学ソフトProphet (BBN Inc.) を用いて作成 (シグモイドモデル使用) され、ANOVA ($p < 0.05$) による検定の結果、毎回とも良好に一致し、相関係数

*1 Division of Clinical Pharmacology, Stanford University School of Medicine
Stanford University Medical Center, Room S-169
Stanford, CA 94305-5113, U.S.A.

*2 浜松医科大学薬理

Tab. 1 測定内再現性

	1 ng/ml	8 ng/ml	18 ng/ml
n	6	6	6
平均	1.07	7.56	18.87
SD	0.11	0.49	1.30
CV(%)	10.08	6.47	6.91
精度(%)	6.63	5.46	4.85

Tab. 2 測定間再現性

	0.4 ng/ml	8 ng/ml	18.54 ng/ml*
n	6	6	6
平均	0.39	7.96	16.06
SD	0.07	0.67	1.95
CV(%)	17.23	8.43	12.12
精度(%)	1.95	0.53	13.35

*血清中

は $r^2 > 0.99$ と高かった。測定限界は0.3 ng/mlと定められた(精度、CV<20%)。測定内及び測定間の再現性は十分だった(Tab. 1, 2)。固相回収率は $89 \pm 3\%$ (平均 \pm SD)であった。検体測定の結果、最高値は15.73 ng/mlであり、服薬約12時間後までの血漿中ddC濃度がこの方法の測定範囲内に収まった。

考察

市販されているRIAキットではddC濃度測定限界は、3 ng/mlである。固相カラムによるddC抽出・濃縮により、0.3 ng/mlまでのddC濃度測定が可能となった。この測定限界は一般的投与量0.75 mg投与後、投与間隔全体にわたって血漿中ddC濃度を測定するのに十分である。従って pharmacokinetics studyやcomplianceの確認などにも適している。

この固相抽出法では特殊な技術や機器が不必要である上に操作が簡単で比較的安全な試薬(水とメタノール)を調整せずに少量使用するのみである。そのため、HPLC-MS法に比べて、compliance

の確認やpopulation pharmacokinetics解析など多数の検体を測定するのに適しており、TDM等臨床応用にも向いている。

結論

固相カラムによるddC抽出・濃縮により、市販RIAキットによる血漿中レベルのddC濃度測定が可能となった。この方法は、簡便なので大規模臨床試験や臨床応用に適している。

文献

- 1) Shelton, M.J., O'Donnell, A.M. and Morse, G.D.: Zalcitabine. *Ann. Pharmacother.*, **27**: 480-489 (1993)
- 2) Mitsuya, H. and Broder, S.: Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotrophic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**: 1911-1915 (1986)
- 3) Kelley, J.A., Litterst, C.L., Roth, J.S., Vistica, D.T., Poplack, D.G., Cooney, D.A., Nadkarni, M., Balis, F.M., Broder, S. and Johns, D.G.: The disposition and metabolism of 2',3'-dideoxycytidine, an in vitro inhibitor of human Tlymphotrophic virus type III infectivity, in mice and monkeys. *Drug Metab. Disposit.*, **15**: 595-601 (1987)
- 4) Hawkins, M.E., Poplack, D.G., Pizzo, P.A. and Balis, F.M.: High-performance liquid chromatographic method for the analysis of 2',3'-dideoxycytidine in human plasma. *J. Chromatogr.* **532**: 442-444 (1990)
- 5) Jajoo, H.K. and Bennett, S.M.: Thermospray liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of anti-AIDS nucleosides: quantification of 2',3'-dideoxycytidine in plasma samples. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **17**: 399-404 (1988)
- 6) Product Information, 2',3'-dideoxycytidine-(2',3'- 3 H) for immunoassay. Product No. D-0914. Sigma Chemical Co.