

多孔質ガラスを用いる Cyclosporin A の HPLC

High-Performance Liquid Chromatography of CyA with Chemically Modified Porous Glass

高井 信治*・松島 美一**・大坪 修**
葛原 敬八郎**・柳沢 孝嘉**・山田 豊***Nobuharu TAKAI, Yoshikazu MATSUSHIMA, Osamu OHTUBO, Keihachiro KUZUHARA,
Takayoshi YANAGISAWA and Yutaka YAMADA

1. はじめに

Cyclosporin (以下 CyA と略す) は、免疫抑制剤としての効果があることが見いだされ、臓器移植の際発現する場合のある急性拒絶反応を抑制する目的に広く用いられている。しかし、この薬剤は強い腎細胞毒性と肝細胞毒性のあることがすでに知られており、副腎皮質ホルモンのプレドニンなどを併用することが多いために、投与にあたっては、きわめて細心の注意をする必要がある。この最も大きな理由として、腎毒性などの副作用が相乗的に発現するからである。

したがって、急性拒絶反応の発現の際、過量投与を行うとすでに述べたような副作用が発現し、低用量投与の場合には、拒絶反応の抑制が不十分となる。

このため、移植患者の疾患状況に応じて血中濃度を厳密にコントロールするための計測法の開発が要求されている。

さらに、この分析は、比較的、短時間に血中濃度を認識することが要求されており、この点についても併せて検討を行った。

2. 超高速液体クロマトグラフィーの開発

高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略す) は、1970 年代の末に、カラム充てん剤の発明と周辺機器の開発が行われ、現在までにすばらしい発展をした分離分析の手法であることは良く知られている。しかしこの分離分析法の最終目標は、一つのピークについて 1~5 分を目的としていた。

しかし、現在はこの目的は完全にクリアーされ、さらに短時間で、同様の結果を得ることができる超高速液体クロマトグラフィーに目が向けられている。

この事柄を達成するために、現在の機器を大幅に変え

ることなく行うには、溶液の流速を大きくすればある程度の結果を得ることができるが、大量の溶離液を必要とするため得策ではない。

また小型のカラムを使用することも可能であるが、線速度を同じくらいにして操作すると分離が不完全となり、分離の精度を上げるためには、分離時間が長くなる。したがって、いずれの方法でも一長一短あって、すべてを満足しない。

そこで新たにカラム充てん剤を改質して、超高速液体クロマトグラフィーの開発を行い、CyA の分析を試みた。

すでに明らかにされているように、HPLC を高速化するためには、充てん剤の吸脱着速度を速くすることが要求される。この目的のためには、充てん剤表面の吸着層の厚みを出来るだけ薄くすれば良いが、理想的な形状で

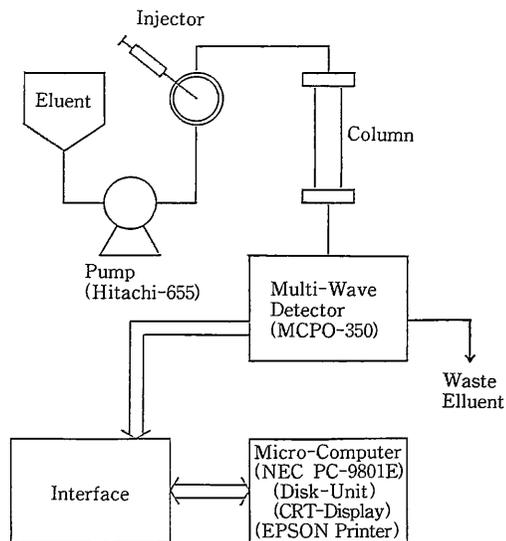
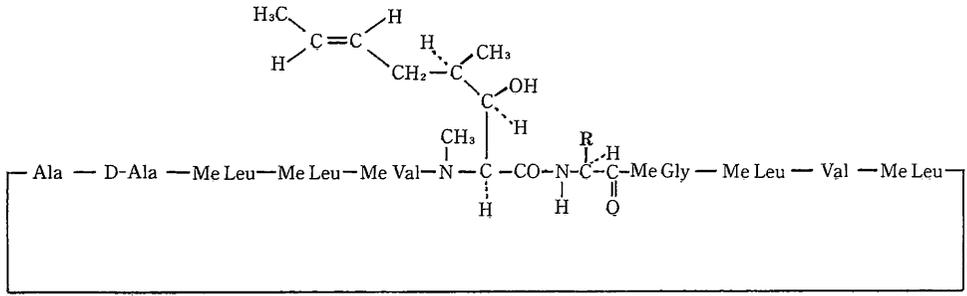


図1 Block diagram of HPLC

*東京大学生産技術研究所 第4部

**元東京大学医科学研究所 (現虎の門病院)

***元東京大学医科学研究所 (現山梨医科大学)



CyA : R = -CH₂CH₃
 CyD : R = -CH(CH₃)₂

図 2 Chemical structure of cyclosporin

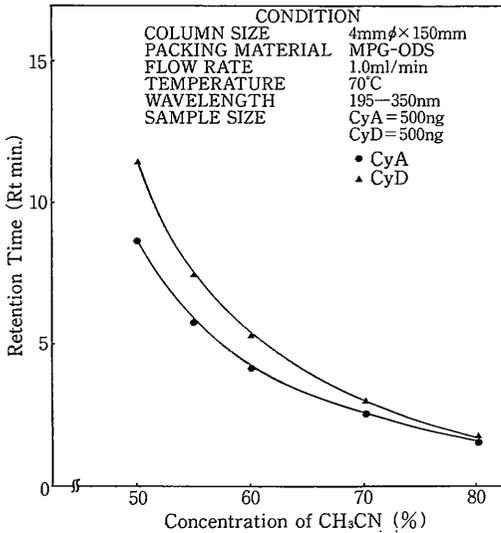


図 3 Relation between concentration of acetonitrile and retention time

あるペリキュラー型は、吸着容量が少なく、生体試料などの系では得策ではない。したがって多孔質のシリカゲルが使用される。しかし、吸脱着速度が早くできると思われる大孔径のものは、機械的強度が弱く、実際的でない。

これらの事柄を満足するための充てん剤として、多孔質ガラスを選び、超高速液体クロマトグラフィーの可能性について検討したところ、良い結果が得られたので、これを用いて、CyAのクロマトグラフィーの溶離挙動をしらべた。

3. 実 験

3.1 装置

実験に使用した装置は、ポンプ (日立655) サンプルイ

ンジェクター (レオダイン 7125) また検出には、波長固定型UV検出器 (日立655) および多波長検出器として、MuLT-320 (日本分光) を使用した。

カラム充てん剤は、新たに開発した多孔質ガラス (伊勢化学) を化学修飾したものを 4φ×150mmのステンレスカラムに充てんして使用した。

なお、多孔質ガラスは、550Åの孔径を持つバイコールガラスで、10μmに粒子径をそろえたものを使用した。

試薬は、すべて試薬特級を用い、溶離液に用いるアセトニトリルは、高速液体クロマトグラフィー用 (和光純薬) を使用した、溶離液は使用直前に20分間超音波を用いて脱気したシクロスポリンは商品名、また標準品はサンド社より恵与されたものを使用した。

まず、標準試料のCyAと、内部標準に用いるCyDの溶離挙動について検討した。また商品としてはサンディミュン (サンド社) のものをそのまま使用した。

患者血液は、東大医科学研究所、臓器移植科において母親から生体腎の提供を受けた33歳男性の急性拒絶にCyAを投与されたときの血液を使用した。

なおCyA, CyDの化学構造を図2に示す。

4. 結果および考察

まずHPLCの溶離条件を求めるためにCyA, およびCyDの標準品について、検討を行った。CyA, CyDは少量のアセトニトリルに溶解し、溶離液で濃度を調整し最終的に500ng/10μlになるように調整した。またサンプルに注入する試料は、すべて10μlに固定した。

まず、溶離液の組成と溶離時間の関係を明らかにする目的で、アセトニトリルと水の混合比を50:50~80:20の間で求めた溶離液組成のほかは、すべて流速を1ml/min, カラム温度は70°Cに固定した。結果を図3に示す。

次に流速の影響を見る目的で、溶離液組成をアセトニトリル/水の比を55:45に固定し、0.5ml/min~2.0ml/

研究 速 報

minの間で求めた。結果を図4に示す。

さらにカラム温度の影響を見る目的で、アセトニトリル/水の混合比を同様に、55:45に保ち、流速は1ml/minに固定したまま、25°C~70°Cの測定を行った。結果を

図5に示す。

以上の結果、いくつかの条件を明らかにすることができた。

まず、溶離液組成の影響については、アセトニトリルの

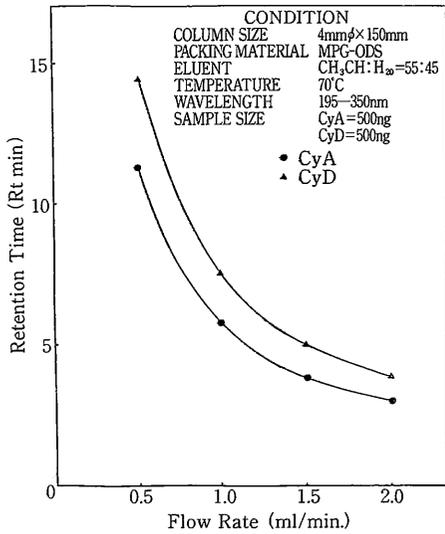


図4 Relation between flow rate and retention time

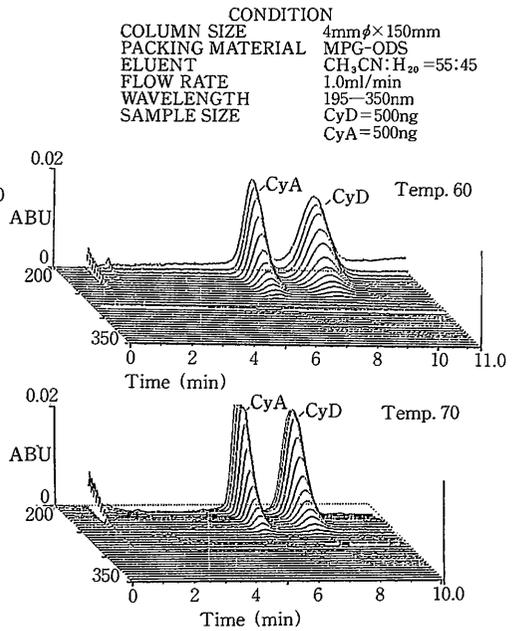
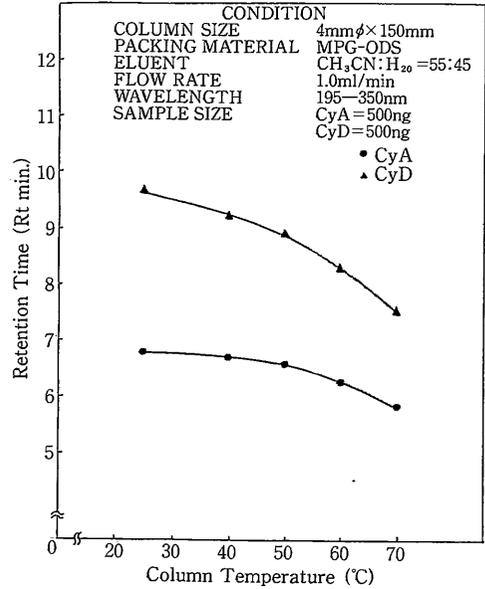


図5 Effect of oven temperature on the chromatograms of CyA and CyD

研 究 速 報

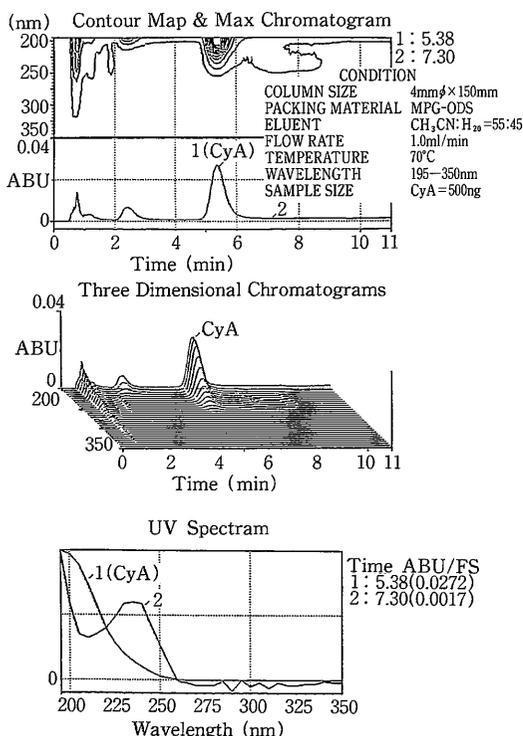


図 6 Sandimmun concentrate for infusion

量が増加するにしたがって、両者共保持時間は速くなる傾向が見られた。しかし、アセトニトリルが80%を越えるとCyA, CyDのピークは接近し、分離が不完全になった。

次に流速の影響については、流速を増すに従って、溶出時間は当然のことながら速くなった。

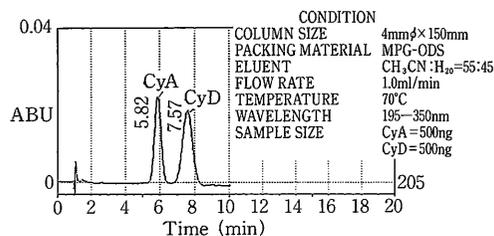
これらの結果から、保持時間は、溶離液濃度が大きく影響していることが明らかになった。

カラム温度については、温度の上昇と共に、溶離液組成および、流速が同一でも、溶出時間は速くなる傾向が見られた。さらに、分離率についても向上することが明らかとなった。

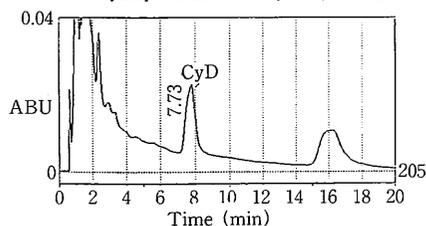
以上の結果を基に、検量線を求めたところ、きわめて直線性の良い値を得たので、市販品について、検討を行った。

市販品は、サンディミュ注射液(スイス・サンド)を用いたHPLCの溶離条件は、標準品から得た値のうち次の条件を選んだ。溶離液には、アセトニトリル/水、55:45、カラム温度70°C、流速は1 ml/minとした。結果を図6に示す。

実験の結果、主ピークは、標準品と同一の保持時間を示したが、CyAの近くに標準品には含まれていない小さ

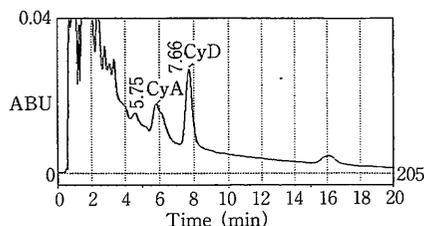


(A) Cyclosporine standards (CyA & CyD 500ng)



(B) Pooled plasma to which 500ng of CyD was added per ml

図 7 Representative chromatograms of CyA and CyD



Plasma from a Patient Receiving CyA

図 8 Representative chromatograms of CyA and CyD

なピークが現れたがこれは、製剤時に添加された物質と考えられる。

これまでに得られた結果を基にして、腎移植時の急性拒絶反応時にCyAを投与した患者から採血したサンプルについて検討を行った。

HPLCは、CyA投与前と投与後のサンプルについて検討を行った。

まず血清1 mlにCyDの標準品を500ng添加し、エーテル抽出後、酸、アルカリの前処理を行ったときのクロマトグラムを図7に示す。

またCyAを投与後、3時間後の血液について、同様の操作を行ったクロマトグラムを図8に示す。

以上の結果から、血液中に含まれるCyAはHPLCで、約10分で分離分析の行えることが明らかとなった。したがって前処理を含めて20分程度で結果を得ることが可能となったため、将来臓器移植ばかりでなく、免疫系の疾患にも大いに寄与するものと思われる。

(1989年1月6日受理)