norethindrone 及び lynestrenol の体内動態

—高速液体クロマトグラフィーによる検討—

京都府立医科大学産婦人科学教室

(主任: 岡田弘二教授)

保田 仁 介, 藤井 正 博, 塚本 克 美,
山元 貴 雄, 本庄 英 雄, 岡田 弘 二

Pharmacokinetics of Norethindrone and Lynestrenol Studied by HPLC

**Jinsuke YASUDA, Masahiro FUJII, Katsumi TSUKAMOTO,
Takao YAMAMOTO, Hideo HONJO and Hiroji OKADA**

Department of Obstetrics and Gynecology,

Kyoto Prefectural University of Medicine,

Kyoto, Japan

(Director: Prof. Hiroji Okada)

The concentration of norethindrone in plasma samples from subjects receiving norethindrone (norethisterone) and lynestrenol orally was measured by high pressure liquid chromatography (HPLC). Norethindrone is a synthetic gestagen widely used in contraceptive formulations, and lynestrenol is also a synthetic gestagen which is metabolized to norethindrone in humans. But the evaluation of plasma norethindrone levels in subjects receiving lynestrenol has not yet been reported. After the administration of norethindrone, the peak level of norethindrone in the plasma was obtained within 2h, and the peak concentration in the plasma was about 3.5ng/ml/mg norethindrone. During a period of 2~6hs after the administration of norethindrone, the half life of norethindrone in the plasma was approximately 1.8h, and during the period of 6~24hs, half life was variable. On the other hand, after the administration of lynestrenol, the peak level of norethindrone in the plasma was obtained within 4h, and the peak concentration of norethindrone was about 1.9ng/ml/mg lynestrenol. During a period of 4~12hs, the half life of norethindrone was about 2.5h. The peak of the norethindrone level after the administration of lynestrenol was lower and appeared later than that after the administration of the same dose of norethindrone. Norethindrone in plasma in subjects receiving lynestrenol could be measured for a longer period than in those receiving the same dose of norethindrone. These results suggest that lynestrenol is stored in fat tissue and is slowly metabolized to norethindrone.

はじめに

現在、臨床で使用されている合成黄体ホルモン剤は多いが、その確実な効果の反面、悪心、嘔吐などの消化器症状や、肝機能障害、血栓症等の副作用も指摘されている。これらの薬物を副作用は少なく、より安全に使用するためには、その体内動態を知り、適切な投与方法、投与量を決定しなければならない。合成黄体ホルモン剤には、投与したスラロイドそのものではなく、代謝物が黄体ホルモン作用をあらわすものも多いし、卵胞ホルモン剤と併用して投与する機会も多いので、その体内動態を知るとはさらに重要である。

体内動態測定の方法として、RIA 等により経時的にスラロイドを測定する方法や、放射性ステロイドを投与し、その放射能の変化を測定する方法が用いられてきたが、これらの方法は、放射性ステロイドの人への投与という問題や、RIA においては、特異的な抗体の作製という困難な問題を含んでいる。ステロイドの測定は、その吸収スペクトルを利用するのが、最も単純で、簡単な方法ではあるが、通常の方法では十分な感度が得られないためこれまで利用されなかった。しかし最近、高速液体クロマトグラフィーのディテクターとして、感度の高いものが得られるようになり、種々の物に利用されつつある、そこで今回、われわれは、代表的な合成黄体ホルモン剤である norethindrone (17 α -ethynyl-19nortestosterone, norethisterone, ENT) 及び体内で norethindrone となり作用する lynestrenol (17 α -ethynyl-4estrene-17 β -ol, ethynyl estrenol) について経口投与後の各々の血中 norethindrone 濃度の変化を高速液体クロマトグラフィーを用いて検討を行なった。

材料及び方法

ステロイド及び試薬

norethindrone は塩野義製薬株式会社より、又 lynestrenol は Organon 社 (Holland) より提供されたものであり norethindrone と合成エストロゲン剤である mestranol (17 α -ethynyl-estradiol-3-methyl-ether) との合剤はノアルテン D錠®を用い lynestrenol と mestranol との合剤はリンデオール®を用いた。

抽出に用いたジクロロメタン、及びその他は特級試薬を用い、クロマトグラフィーに用いたメタノールは液体クロマトグラフ用 (関東化学社製) を用いた。

投与方法

種々の量の norethindrone 及び lynestrenol さらにそれぞれの mestranol との合剤を健康男子に経口的に投与し、経時的に末梢静脈血を採取し、その norethindrone 濃度を測定した。

測定装置

今回、測定に用いた高速液体クロマトグラフィー装置は、医理化工業社製で、ポンプは Model P-311 を、カラムは ODS 系の IRICA RP-18 を用いた。またディテクターは UV detector IRICA Model S-301 を用い波長 240 nm、感度 0.02 aufs で測定した。これらの操作は室温で行なった。移動層としては、メタノール/水、70:30 とし、流速 0.5 ml/min で用いた。

試料の調整

Fig-1 は試料の調整法を示したものである。血清サンプル 1.0 ml に内部標準物質として合成黄体ホルモン剤の 1 つである, medroxy-progesterone acetate (6 α -methyl-17 α -acetoxy-progesterone, MPA) 500 ng を加え、その後 5 ml のジクロロメタンで 3 回抽出した。これを 10 分の 1 量の 0.1 N HCl, さらに 10 分の 1 量の 0.1 N NaOH で洗浄し、その後 10 分の 1 量の蒸留水にて 3 回洗浄し、

中性を確認した。ジクロロメタン層を蒸発乾固した後、これを約0.4mlのメタノールにて再溶解し、HPLCの試料とした。

本測定法の accuracy について検討するため男子血清1.0mlに既知量のnorethindroneを加え、全測定操作を行い個々の測定値を求めた結果はFig-2の如くであり、6.25~200ng/mlの範囲で coefficient of variationは9.5~16.8%と、ほぼ満足すべきものであった。

Fig. 1.

samples	n	ENT added (ng)	ENT quantified			
			mean (ng)	standard deviation	standard error	CV (%)
male plasma 1.0ml	5	6.25	6.2	1.04	0.84	16.8
	5	12.5	11.7	1.75	1.43	14.9
	5	25	26.8	3.6	3.25	13.4
	5	50	54	6.5	5.8	12.0
	5	100	113.6	13.0	11.6	11.4
	5	200	205.4	19.5	17.4	9.5

Fig. 2.

結 果

Fig-3はnorethindrone投与後、3時間のクロマトグラムである、norethindroneの retention timeは16.2分であった。

Fig-4は5~50mgのnorethindroneを経口的に投与したさいの血中norethindrone濃度、及びnorethindrone 1mgあたり mestranol 0.03mg投与したさいの血中norethindrone濃度の変化を示したものである。norethindrone単独投与では、投与後2時間にて、norethindroneは最高濃度となり、その値は、投与1mgあたり約3.5ng/mlとなった。また血中濃度の減少は2相性であり、投与

後2～6時間では、半減期約1.8時間であり、6時間以後では、個人差があるが、ほぼ8～12時間であった。また norethindrone 1mgあたり0.03mgの mestranol を合わせて投与したさいにも、やはり投与後2時間にてピークがあらわれ、投与後6時間以上にわたり、半減期にほとんど影響はみられず、単独投与と同様の減少パターンを示した。

Fig-5は lynestrenol 20mg 投与後2時間後のクロマトグラムである。この図ではチャートスピードは Fig-3の2倍となっている。

Fig-6は lynestrenol 単独、及び lynestrenol 1mgあたり0.03mgの mestranol を併せて投与したさいの血中 norethindrone 濃度の変化を示している。投与後4時間で、norethindrone のピークがあらわれている。mestranol をあわせて投与した際、このピークは lynestrenol 1mgあたり約1.9 ng/mlであった。このような条件下での計算では norethindrone 投与時のピークの約2分の1の値となった。血中 norethindrone 濃度の減少は、やはり2相性であり、投与後4～12時間では半減期は約2.5時間となった。lynestrenol 単独投与においても約4時間後に血中 norethindrone 濃度はピークとなり、減少の傾向は mestranol を併せて投与したさいと同様であり、mestranol 併用による差はみられなかった。

Fig. 3.

Fig. 4. Plasma concentration of norethindrone after oral administration of norethindrone only and norethindrone with mestranol.

— norethindrone
 --- norethindrone with mestranol

Fig. 5

Fig. 6. Plasma concentration of norethindrone after oral administration of lynestrenol only and lynestrenol with mestranol.

--- lynestrenol
— lynestrenol with mestranol

Fig. 7

考 察

Kamyabらは、非妊婦人に ^{14}C -norethindroneを投与し、その血中放射能の変化について検討している²⁾。投与後4時間で、血中には投与量の約10%が残存しているが、そのうち遊離型のスラロイドは2分の1以下であり、投与後12時間たつと、1%以下でしかないとして、norethindroneの代謝がかなり速い事を指摘している。さらにKamyabらは、正常男子に ^{14}C -lynestrenolをやはり経静脈的に投与し、その血中放射能の変化を検討している³⁾、これによると、投与後4時間で、血中の遊離型ステロイドは、1%以下でしかなく、血中放射能の減少はnorethindroneよりずっと早いとしている。Molen⁴⁾らは、経口的に ^{14}C -lynestrenolを投与し、血中放射能の変化をみているが、これによると、投与後4~6時間で血中放射能はピークとなり、72時間後までは、直線的に減少し、その半減期は40時間であったと報告しているが、同時に、このような方法では、lynestrenol及び、その代謝物の血中の総和を測定しているとして、他の方法による検討の必要な事を指摘している。これら標識ステロイドによる測定では、実際norethindrone, lynestrenolのほかこれら血中の代謝物などもすべて含まれるため、norethindrone, lynestrenolの血中動態は、なお明らかではない。

Warren⁹⁾, Fiotherby¹⁾らはRIA法により血中norethindrone濃度を測定している。Warrenは、norethindrone 1mgを経口的に投与しているが、投与後1時間でnorethindroneはピークとなり、その値は約6 ng/mlである。血中濃度の減少は2相性であり、投与後2～8時間では、半減期3時間、投与後8～24時間では半減期5時間と述べている。今回我々の行った測定では、血中norethindrone濃度の変化は、WarrenらのRIA法によるものと類似のパターンを示したが、ピークの値は我々の測定のほうが低いものとなった。WarrenらのRIAに用いられた抗体は、5 β -Dihydroneorethindrone, 3 α , 5 β -Tetrahydronorethindroneなどの代謝物と、100%のcross-reactionもあるものである。我々はnorethindroneの Δ^4 -3-Ketoの構造に注目し、紫外部240 nmにて測定した。norethindrone及びlynestrenol投与前にnorethindroneと同一のretention timeの部分には240 nmの吸収を示すピークは認められず、又norethindroneの代謝物が Δ^4 -3-Ketoの構造を持たない事、又一方男子血清中には、3～7 ng/mlのアンドロゲンが存在するが、その大部分をしめるtestosteroneはretention timeが約20.0分とnorethindroneとretention timeで4分の差があり、明らかに異なり、1 ng/ml程度存在する Δ^4 -androstendroneは量的に少なく、さらにretention timeが約18.4分でnorethindroneのretention timeと2分相異なることなどから問題になることはなかった。

lynestrenolはFig-7に示したようにnorethindroneの3位のケトンのない化合物であり、肝において3位が水酸化され、さらにこれが酸化されてnorethindroneとなる⁶⁾⁷⁾。lynestrenolとウサギ肝とのin vitro インキュベーション実験でnorethindroneが産生されるし、又lynestrenolを投与した婦人の血中にnorethindroneが確認されている⁵⁾。生体内でのlynestrenolよりnorethindroneへの反応は、かなり完全に進行し、lynestrenolを投与した後の尿中代謝産物はnorethindrone投与時のそれと一致する⁸⁾。

このlynestrenolのように、生体内でnorethindroneに変化するものの血中norethindrone濃度の変化についてはこれまで報告がない。今回、高速液体クロマトグラフィーを用いて、血中norethindrone濃度を測定したが、lynestrenol投与時の血中norethindrone濃度はnorethindrone投与時のそれとくらべて、血中でのピーク形成に4時間と、より時間を要すること、ピーク時のnorethindrone濃度はlynestrenol投与1 mgあたり約1.9 ng/mlと、norethindrone投与1 mgあたり約3.5 ng/mlであるのに比べて約2分の1となること、さらに図には示さないが、lynestrenol投与時にはnorethindrone投与時より、より長時間にわたりnorethindroneが測定可能なことなどが明らかになった。これはlynestrenolが3位にケトンを持たないためにnorethindroneより極性が低く、生体の脂質にとけこみやすいこと、lynestrenolよりnorethindroneへの代謝に時間を要することなどが考えられた。

文 献

- 1) Fotherby. K, Warren. R, Shrimanker. K, Siekmann. L, Siekmann. A, Breuer. H: Plasma levels of norethisterone measured by radioimmunoassay and gaschromatography-mass-fragmentography, J. Steroid Bi, 10, 121–122, 1979.
- 2) Kamyab. S, Fotherby. K, Klopper. K: Metabolism of [4-¹⁴C] Norethisterone in women, J. Endocr, 41, 263–272, 1968.
- 3) Kamyab. S, Fotherby. K, Klopper. K: Metabolism of [4-¹⁴C] Lynestrenol in man, J. Endocr, 42, 337–343, 1968.
- 4) Molen. H, Hart. P, Wijmenga. H: Studies with 4-¹⁴C-Lynestrenol in normal and lactating women, acta endocr, 61, 255–274, 1969.
- 5) 村田修吾: Estrane系 Progestineの生体内代謝に関する研究。日

- 内泌誌, 43, 1083—1096, 1973. 6) 岡田弘二, 太田 智, 武 博彦, 山本 浩: 17d-Ethynyl-4-estrene-17 β -olの肝におけるC₃の酸化。日内泌誌, 40, 1095—1098, 1964.
- 7) 岡田弘二, 角 玄信, 阿原道正, 石原政芳: ウサギ肝における3-deoxosteroidの代謝。日内泌誌, 44, 1264, 1968. 8) Okada. H: Conversion of 3-deoxosteroids to the corresponding 3-ketosteroids in vitro and in vivo, *Excepta Medica Inten Cong Ser*, No. 256, 211, 4th Inten. Congr. Endocrinol, Washington (1972). 9) Warren. S, Fotherby. K: Radio-immunoassay of synthetic progestogens, norethisterone and norgestrel, *J. Endocr*, 62: 605—618, 1974. (受付日: 56. 2. 5)