HPLCによる簡便なミトタン血中濃度測定法の開発および適用

内山将伸^{*1}, 原 周司², 緒方憲太郎¹, 今村 健¹, 高松 泰³, 田村和夫³, 二神幸次郎¹
福岡大学病院薬剤部¹, 福岡大学薬学部医療構造学², 福岡大学医学部腫瘍・血液・感染症内科学³

A Simple and Rapid HPLC Method for the Determination of Mitotane in Human Plasma and its Application to a Patient

Masanobu Uchiyama^{*1}, Shuui Hara², Kentaro Ogata¹, Takeshi Imamura¹,
Yasushi Takamatsu³, Kazuo Tamura³ and Koujiro Futagami¹

Department of Pharmacy, Fukuoka University Hospital¹,

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University²,

Division of Medical Oncology, Hematology and Infectious Disease, Fukuoka University³

〔 Received August 30, 2011
Accepted December 11, 2011 〕

Mitotane has been used for adrenal cancer and inoperable Cushing's syndrome. In a previous study, monitoring of the plasma mitotane level is important for assessments of efficacy and adverse drug reactions such as digestive symptoms. A simple and highly sensitive high-performance liquid chromatographic method was developed for the determination of mitotane in human plasma. Mitotane and 2,2-diphenylpropane as an internal standard were extracted from plasma with ethyl acetate. They were separated by a J'sphere ODS-H80 column with a mixture of methanol-acetonitrile-water (81:6:13, v/v/v) as a mobile phase, and were then detected with a UV detector at 210 nm. The within- and between-day variations for Mitotane were reliable. The method is very simple, rapid, sensitive and selective for mitotane, and may therefore be useful as a routine analysis for the therapeutic drug monitoring of mitotane.

Key words — mitotane, high performance liquid chromatography, adrenal cancer, plasma concentration

緒 言

ミトタン (1,1-dichloro-2-[*o*-chlorophenyl]-2-[*p*-chlorophenyl]ethane : DDD, Fig. 1) は副腎皮質細胞を破壊する作用と種々のステロイド合成酵素阻害作用を有することから、本邦では1984年3月から副腎がんおよび手術不能のクッシング症候群の治療薬として使用されている。副腎がんは極めて頻度が低い疾病であるが、5年生存率が20～35%であり、根治的手術が不可能な症例や再発症例にはDDDが薬物療法の中心を担っている。DDDの抗腫瘍効果は血中濃度に依存し、trough値が14～20 μg/mLの範囲で抗腫瘍効果が期待で

きるとされ、消化器症状、神経・精神症状や中枢神経中毒症状といった副作用はtrough値が20 μg/mL以上で起こりやすいことが報告されている¹⁻³⁾。従って、DDD療法を効果的に施行するにはDDDの血中濃度モニタリングが必要である⁴⁾。また、DDDは毒性が強いため、副作用を回避するためにlow-dose (2-3 g/day) より開始し、3～5カ月後に目標値 (trough値14-20 μg/mL) に到達させる方法が推奨されている⁵⁾。

現在、DDDの測定法としてはFranciaら⁶⁾が開発した方法が繁用されている。この測定法はDDDおよびその代謝物を同時測定することができるが、前処理として溶媒および固相抽出を必要とす

* 福岡県福岡市城南区七隈七丁目45番1号

Fig. 1 Chemical structures of DDD(A), and DPP(B) as an internal standard.

るため煩雑である。また、代謝物の一つである 1,1-dichloro-2-[*p*-chlorophenyl]-2-[*o*-chlorophenyl] ethane (DDE) は 12 カ月を越える長期的な予後に関係しているという報告⁷⁾もあるが、未だ明らかにはされていない。

今回、副腎がん患者に対して DDD を low-dose (1 g/day) から開始することになり、血中モニタリングをする機会を得た。そこで、DDD の日常分析に適した簡便な測定法を開発し、患者の血中 DDD モニターを行った。

方 法

1. 試薬

DDD および 2,2-diphenylpropane (DPP, Fig. 1) は Sigma-Aldrich 社より購入した。メタノール、エタノール、アセトニトリル、酢酸エチルおよび精製水は HPLC 用を用いた。その他の試薬は市販特級品を使用した。

2. 標準溶液および内部標準物質の調製

DDD 標準溶液は DDD 15.0 mg をエタノールに溶解して 10 mL とした。同様に内部標準物質 (IS) として DPP 13.0 mg をエタノールに溶解して 10 mL とした。これらの溶液はそれぞれ 4℃ で保存し少なくとも 2 カ月間は安定であった。

3. 検量線用スタンダードの調製

検量線用スタンダードは DDD 標準溶液 (1.5 mg/mL) をエタノールで希釈し、DDD 濃度がそれぞれ 25.0, 62.5, 125, 250, 375, 750 μg/mL とした。本 DDD 溶液を健常人の血漿中濃度で 0.5, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 15.0 μg/mL となるよう調製した。

4. 測定機器および測定条件

HPLC 分析装置には日立 L-7120 ポンプおよび日立 L-7405 紫外・可視検出器を用いた。分析カラムには J'sphere ODS-H80 column (4 μm, 4.6 mm × 150 mm, YMC) を用い、ガードカラムとして YMC-ODS (3 mm, 2.0 × 10 mm) を室温 (15~20℃) で使用した。移動相はメタノール：アセトニトリル：水 = 81 : 6 : 13 (v/v/v) を 1.0 mL/min で送液して分析を行った。HPLC 注入量は 15 μL で、210 nm で検出した。DDD 濃度は IS に対するピーク面積比から求めた。

5. 試料調製

5 mL のねじ口試験管に、血漿試料 500 μL を分取し、10 μL の IS 溶液、約 50 mg の NaCl および 900 μL の酢酸エチルを順次添加し、Vortex-mixer で約 5 分間攪拌する。遠心分離 (2000 × g, 10 分) 後、酢酸エチル層を 1.5 mL の遠心用チューブに分取し、50℃ で減圧乾固する。残渣をエタノール 100 μL に再溶解し、15 μL を HPLC に注入した。

健常人血漿は当研究室員からボランティアとして提供を受けた。

6. 精度および真度

日内再現性は 0.5, 2 および 10 μg/mL になるように調製した DDD の血漿試料について各濃度につき 5 回繰り返し定量することによって評価した。また、同様の濃度で 5 日間にわたり定量することで日間再現性を評価し、真度は (定量値 / 理論値) × 100% として評価した。

7. 患者背景

72 歳、女性、身長 152 cm、体重 44 kg

約 30 年前に副腎がんに対して、左副腎全摘術を施行された。左腎、肝臓、左肺横隔膜、横行結

腸、傍大動脈リンパ節転移および腹腔腫瘍に対して、切除を繰り返していた。約5年前に転移性骨腫瘍を認め、放射線治療が実施されていた。患者はフェンタニルやアミトリプチリン、イミダプリル、硝酸イソソルビド、モサプリド、ゾルピデム、ランソプラゾール、酸化マグネシウム、センノサイドを服用中であった。

8. 患者血漿試料

DDD を 1000 mg/day (1～9 日目), 3000 mg/day (10～25 日), 4500 mg/day (26～71 日目) にてそれぞれ服用し、いずれも 3, 12, 28 日目にペパリン処理採血管にて採血を行った。採血時刻は 1000 mg/day 服用時は 2, 4 時間後, 3000 mg/day では 2, 4, 6 時間後, 4500 mg/day では 2, 4, 6 時間後にそれぞれ採血した後、速やかに遠心分離し、得られた血漿を測定まで -20°C で凍結保存した。対象患者へは担当医師よりヘルシンキ宣言に基づき十分に説明し書面にて同意を得て、血中濃度測定を行った。

本研究は福岡大学病院臨床研究審査委員会の審

査および承認を得ている。(承認番号: 第 11-11-16 号)

結 果

1. クロマトグラム

DDD および IS を添加した健常人血漿 (A) および DDD 服用患者 (B) より得られたクロマトグラムを Fig. 2 に示す。DDD のピークが約 6 分, IS のピークが約 7 分に検出され、患者血漿より得られたクロマトグラムにおいて、内因性物質およびほかの治療薬における妨害ピークは検出されなかった。

2. 直線性

検量線は DDD の添加血漿濃度に対する、IS のピーク面積と DDD のピーク面積比より求めた。検量線は DDD 濃度として $0.5\sim 15\text{ }\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲において良好な直線性を有し、回帰直線は、 $y=3.2861x+0.0727$ であり、相関係数 (r) は 0.999 であった。

Fig. 2 Chromatograms obtained from human blank plasma spiked with mixture of DDD ($5\text{ }\mu\text{g/mL}$) and IS ($13\text{ }\mu\text{g/mL}$) (A) and from a patient plasma after the treatment with mitotane ($3.05\text{ }\mu\text{g/mL}$) (B). Peaks: 1, DDD; 2, IS; 3, unknown.

Table 1 The within-and between-day precisions of the HPLC method for determining mitotane in plasma sample.

DDD added concentration (μg/mL)	within-day (n = 5, each)	between-day (n = 5, each)
	RSD ¹⁾ (%)	RSD ¹⁾ (%)
0.5 μg/mL	5.5	5.7
Mitotane 2 μg/mL	3.5	4.2
10 μg/mL	1.8	2.5

1) RSD : relative standard deviation

Table 2 Concentrations of a plasma sample obtained from an adrenal cancer patient subject.

Day	Daily Dose	Time	Concentration (μg/mL)
3	1000 mg	2 h	1.60
3	1000 mg	4 h	3.05
12	3000 mg	2 h	8.86
12	3000 mg	4 h	5.48
12	3000 mg	6 h	4.98
28	4500 mg	2 h	9.48
28	4500 mg	4 h	8.59
28	4500 mg	6 h	7.31

3. 精度および真度

日内および日間再現性について評価した結果を **Table 1** に示す。精度は変動係数 (CV) として評価し、日内再現性は 1.8~5.5%, 日間再現性は 2.5~5.7% であった。真度は (定量値/理論値) × 100 % として評価し、日内再現性は 99.9~104.7%, 日間再現性は 99.2~107.0% であった。

4. 定量下限値

DDD の定量下限値は 0.31 μg/mL (S/N=3) であり、この濃度における日内再現性および日間再現性における CV は 9.25 % 以下であり、真度は 105.7~108.0% であった。

5. 患者血漿中濃度

1 g/日は 3 日目, 3 g/日は 12 日目, 4.5 g/日は 28 日目での患者 DDD 血漿中濃度を測定した。その結果を **Table 2** に示す。

考 察

DDD は脂溶性が非常に高く、患者個々の血中濃度に大きなバラツキがみられる薬物である。また、抗腫瘍効果および副作用発現は濃度依存であるため、血中濃度を測定し、投与量を決定することが重要となる。

今回開発した測定法は酢酸エチルによる抽出のみで患者血漿中の DDD を簡便に測定することが可能であった。また、移動層をメタノール：アセトニトリル：水=81：6：13 (v/v/v) にすることで約 7 分と短時間の測定が可能となった。さらに、日内変動および日間変動も小さく、各医療施設においても実施可能であると考えられる。

患者は DDD 開始後、血漿中濃度および副作用症状を観察しながら、徐々に増量を行っていった。しかし、治療域に到達する前の 71 日目に死亡退院された。

現在、切除不能な副腎がんにおける治療では DDD と抗がん剤 (シスプラチン, ドキソルビシン, エトポシド等) との併用療法で高い有効性が示されている^{8~9)}。また、副腎がんの high stage 症例において DDD 単独で血中濃度を 14~20 μg/mL にコントロールした場合に長期生存 (5 年生存率: 67%) が得られることも報告されている¹⁰⁾。

最近、DDD と電離放射線の併用により cell-cycle に働き、G2/M 期で停止させることが報告された¹¹⁾。このことは、DDD の適用拡大の可能性を示唆する。

Francia ら⁶⁾の方法では 2 段階の固相抽出といった煩雑な前処理を必要としていたが、本法は酢酸エチルによる 1 回のみの抽出で非常に簡便で迅速に血漿中 DDD 濃度の測定を可能とし、日常分析法として極めて有用であると考えられる。さらに、代謝物の一つである DDE は長期的な予後への関与が示唆されているものの、未だ明らかにされていない。また、副作用を回避し 3~5 カ月後に目標値に到達させるために DDD の血中濃度モニタリングは重要であり、本法の臨床での有用性は高いものと考えられる。

引用文献

- 1) Haak HR, Hermans J, Velde CJ, Lentjes EG, Goslings BM, Fleuren GJ, Krans HM, Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patients, *Br J Cancer*, 1994, **69**, 947-951.
- 2) Slooten H, Moolenaar AJ, Seters AP, Smeenk D, The treatment of adrenocortical carcinoma with o, p-DDD: prognostic implications of serum level monitoring, *Eur J Clin Oncol*, 1984, **20**, 47-53.
- 3) Baudin E, Pellegriti G, Bonnay M, Penfornis A, Laplanche A, Vassal G, Schlumberger M, Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o, p'DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma, *Cancer*, 2001, **92**, 1385-1392.
- 4) Wängberg B, Khorram-Manesh A, Jansson S, Nilsson B, Nilsson O, Jakobsson CE, Lindstedt S, Odén A, Ahlman H, The long-term survival in adrenocortical carcinoma with active surgical management and use of monitored mitotane, *Endocr Relat Cancer*, 2010, **17**, 265-272.
- 5) Terzolo M, Pia A, Berruti A, Osella G, Alì A, Carbone V, Testa E, Dogliotti L, Angeli A, Low-dose monitored mitotane treatment achieves the therapeutic range with manageable side effects in patients with adrenocortical cancer, *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, **85**, 2234-2238.
- 6) Francia SD, Pirro E, Zappia F, Martino FD, Sprio AE, Daffara F, Terzolo M, Berruti A, Carlo FD, Ghezzi F, A new simple HPLC method for measuring mitotane and its two principal metabolites tests in animals and mitotane-treated patients, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, **837**, 69-75.
- 7) Kasperlik-Zaluska AA, Cichocki A, Clinical role of determination of plasma mitotane and its metabolites levels in patients with adrenal cancer: results of a long-term follow-up, *J Exp Ther Oncol*, 2005, **5**, 125-132.
- 8) Bonacci R, Gigliotti A, Baudin E, Wion-Barbot N, Emy P, Bonnay M, Cailleux AF, Nakib I, Schlumberger M, Comète R, Cytotoxic therapy with etoposide and cisplatin in advanced adrenocortical carcinoma, *Br J Cancer*, 1998, **78**, 546-549.
- 9) Terzolo M, Pia A, Angeli A, Dogliotti L, Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma, *Cancer*, 1998, **83**, 2194-2200.
- 10) Wängberg B, Khorram-Manesh A, Jansson S, Nilsson B, Nilsson O, Jakobsson CE, Lindstedt S, Odén A, Ahlman H, The long-term survival in adrenocortical carcinoma with active surgical management and use of monitored mitotane, *Endocr Relat Cancer*, 2010, **17**, 265-272.
- 11) Cerquetti L, Sampaoli C, Amendola D, Bucci B, Misiti S, Raza G, Paula UD, Marchese R, Brunetti E, Toscano V, Stigliano A, Mitotane sensitizes adrenocortical cancer cells to ionizing radiations by involvement of the cyclin B1/CDK complex in G2 arrest and mismatch repair enzymes modulation, *Int J Oncol*, 2010, **37**, 493-501.