薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
110 (8) 586-590 (1990)

¹³C 標識体-核磁気共鳴 (NMR) トレーサー法の臨床化学への応用.

安息香酸の馬尿酸への代謝率の測定¹⁾

馬場茂雄,* 明楽一己, 佐久間千勢子

東京薬科大学

Application of ¹³C Label-Nuclear Magnetic Resonance (NMR)
Tracer Techniques to Clinical Chemistry. Metabolic Rate
of Benzoic Acid to Hippuric Acid¹⁾

Shigeo BABA,* Kazuki AKIRA and Chiseko SAKUMA

Tokyo College of Pharmacy, 1432-1, Horinouchi,
Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

(Received March 28, 1990)

A new tracer technique, in which a ¹³C-labeled compound as a biological tracer and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) as an analytical tool are used, is proposed. In order to verify the applicability of the method to clinical chemistry, [1-¹³C]benzoic acid was administered and [1'-¹³C]hippuric acid excreted in the urine was quantitated by NMR, by using [1-¹³C]hippuric acid as an internal standard.

Keywords—NMR; carbon thirteen; tracer; clinical chemistry; metabolic rate; urine; benzoic acid; hippuric acid

緒 言

著者らは、1971 年安定同位体をトレーサーとし、ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC-MS) を検出器とする薬物代謝研究法を提案して以来、この方法を用いて *l*-ephedrine,²⁾ butyrylcinnamylpiperazine,³⁾ phenytoin,⁴⁾ testosterone⁵⁾等のヒトにおける代謝を研究した。薬物代謝研究における、この方法の有用性は広く認められ、幾つかの総説⁶⁾が公表されている。しかしながら、この方法は臨床化学ではほとんど利用されていない。これは、GC-MS は、操作に高度の技術を必要とすること、処理した試料数に比例してカラムや検出系の劣化が起こるので多数の試料の連続測定には不向きであること、測定対象の化学形に制約があること、試料の前処理が繁雑であることなどの理由によると考えられる。これに対して、¹³C 核磁気共鳴 (NMR) は臨床化学に好都合な以下のような特徴を有している。NMR 信号の特異性は極めて高いので、多くの場合分離・精製過程を省略しうる。したがって、代謝産物の損失や 2 次的な変化を避けることができる。測定は非破壊的であり、必要ならば測定後に他の分析を実施することができる。測定対象物の化学形には何らの制約もない。また、装置への試料導入は容易に自動化でき、測定は“非接触的”に行われかつクロマトグラフ分析を伴わないのでメモリーが残らないことから、多数の試料の連続測定が容易に行える。このような利点にもかかわらず、感度が著しく低く信号強度の再現性が乏しいという理由で、¹³C NMR は一般的に定性分析手段として用いられている。

¹³C 標識体-NMR トレーサー法では、ほぼ 100% enrich した標識体を測定対象とするので、非標識体 (¹³C 天然存在比 1.108%) の場合と比べて、信号強度は 2 桁向上する。この方法で生体試料中の標識代謝産物を定量した研究例は稀であり、⁷⁾ どの程度の感度と定量精度が得られるかは明らかにされていない。著者らは、¹³C 標識体-NMR トレーサー法は臨床化学において優れた方法になると考え、本論文において、その可能性を benzoic acid (BA) の hippuric acid (HA) への代謝反応をモデルとして検討した。

実 験 の 部

標識体 [1-¹³C]Benzoic acid (¹³C-BA, ¹³C: 99%) 及び [1-¹³C]glycine (¹³C: 99%) は第一化学薬品より購入した。[1'-¹³C]Hippuric acid (¹³C-HA-I) は、dicyclohexylcarbodiimide を縮合剤として、¹³C-BA と glycine

benzylester を縮合した後、接触還元でベンジルエステルを除去することにより、収率 65% で合成した。⁸⁾ [1-¹³C]-hippuric acid (¹³C-HA-II) は、過剰量の sodium hydroxide 存在下 [1-¹³C] glycine と benzoyl chloride を反応させることにより、収率 41% で合成した。⁹⁾

NMR 測定条件 ¹³C NMR はプロトンデカップリング条件下、Bruker AM-400 NMR スペクトロメーター (400 MHz) で測定した。内径 5 mm の測定管を用い、サンプルには NMR ロックのために約 10% の D₂O を添加した。標識体のスペクトルは、特にことわらない限りパルス幅 3 μs (45° パルス), delay time 2 s, 積算時間約 10 min (積算回数 216 回), 測定温度 300 K で測定し、FID は 10.0 Hz の exponential window 処理を施した後フーリエ変換した。化学シフトの基準物質には 3-trimethylsilyl[2,2,3,3-²H₄]propionic acid sodium salt (TSP) を用いた。

NMR 信号強度の再現性に関する実験 ¹³C-HA-I 水溶液 (2.52 mg/ml) 及び ¹³C-HA-II 水溶液 (2.54 mg/ml) の各 0.2 ml を測定管にとり、連続して 5 回 NMR を測定した (積算時間約 6 min)。

服用実験及びサンプル処理 ¹³C-BA 100 mg (0.82 mmol) を経口服用し、0—2, —4, —6, —8, —12, —24 h にわたって採尿した。尿 10 ml (0—2 h, —4 h) 又は 20 ml (4 h 以降) に 2.00 mg の ¹³C-HA-II を添加後、凍結乾燥した。残渣に蒸留水約 1 ml 及び 10 N NaOH 水溶液数滴を添加し、超音波洗浄器で処理した。処理液をクロマトディスク (0.45 μm, 株式会社バイオフィールド) でろ過し、ろ液約 0.4 ml をあらかじめ TSP と D₂O を入れておいた測定管に入れ NMR を測定した。172.9 ppm (1'-¹³C) と 179.3 ppm (1-¹³C) の信号強度比を求め、検量線に従って ¹³C-HA-I の量を算出した。同一被験者から得られた自然尿 10 又は 20 ml についても同様の前処理を行い、ブランク試料とした。

検量線の作成 自然尿 10 ml に ¹³C-HA-II (2.00 mg) 及び ¹³C-HA-I (4.97, 1.99, 0.99, 0.50 又は 0.20 mg) を添加して凍結乾燥し、服用実験の場合と同様の方法で処理して NMR を測定した。

結果及び考察

BA の HA への代謝反応はもっとも簡単な代謝反応の 1 つでありながら、ヒトにおける BA の HA への代謝率を測定することは難しい課題である。あらかじめ HA の尿中排せつ量を測定しておき、BA 服用後に増加する HA の排せつ量を測定する方法が考えられるが、この方法は、HA の尿中排せつ量に大きな日々変動が見られることから現実には成立しない。著者らは、重水素標識 BA をトレーサーとし、GC-MS を検出器として BA の HA への代謝率を測定する方法¹⁰⁾を発表した。しかし、前述の理由によりこの方法は臨床化学ではルーチンな方法として採用されていない。これに対して、特定位置を ¹³C で標識した BA をトレーサーとして服用に用い、尿中に排せつされた ¹³C-HA を NMR で定量する方法は実用性が高いと考えられた。

フーリエ変換 NMR を用いて定量的な実験を行う場合には、一般的に、緩和が完了するようにパルス繰り返し

Fig. 1. NMR Spectrum of Non-labeled Hippuric Acid

About 15 mg of hippuric acid was dissolved in 0.4 ml of distilled water containing a few drops of sodium hydroxide solution, and measured by NMR (pulse width, 5 μs (70° pulse); accumulation time, ca. 30 min; exponential window, 2.0 Hz).

時間を長くし、 ^1H デカップリング条件下では核オーバーハウザー効果 (NOE) を除去しうる方法を採用する必要がある。また、定量の基準とする核の緩和時間及び NOE が、測定対象物質のモニター核のそれらに極めて近いことが要求される。Fig. 1 は非標識 HA の ^{13}C NMR である。HA の Cl' , Cl はそれぞれ 172.9 及び 179.3 ppm に NMR 信号を与えた。Cl' 及び Cl は NOE を示さず、また信号強度がほぼ同一であることから、両者の緩和時間が近似していることが示唆された。したがって、Cl' 及び Cl は互いに優れた内部標準核になると考えられ

た。そこで、市販の $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ BA (^{13}C -BA) を服用に用い、それから生成する尿中の $[1'\text{-}^{13}\text{C}]$ HA (^{13}C -HA-I) を、 $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ HA (^{13}C -HA-II) を内部標準として NMR で定量する方法を検討した。このように、標識位置の異なる同一化合物を内部標準として用いることにより、標識代謝産物の生体試料からの回収率及び NMR 信号強度の変動を確実に補正しようと考えた。なお、BA の Cl は 178.3 ppm に現れるので (もし存在するとしても) 未変化の ^{13}C -BA を同時に定量できる可能性がある。本研究では、臨床化学分析に要求される試料処理速度 (例えば 100 試料/日) を考慮し、特にことわらない限り NMR 積算時間は約 10 min とした。

^{13}C -HA-I と ^{13}C -HA-II はほぼ等モル (2.8 μmol) を含む混合試料について、Cl' と Cl のシグナル強度比の再現性を検討した結果を Table I に示した (積算時間: 約 6 min)。パルス繰り返し時間が緩和時間に比べて極めて短い (ca. 2.8 s) にもかかわらず、積分強度及びシグナル高のいずれについても、良好な精度で強度比を求めることができ、またシグナル高の方が NMR の定量に通常用いる積分強度よりも、強度比の再現性が良好であることが明らかになった。なお、各 0.6 μmol の ^{13}C -HA-I 及び ^{13}C -HA-II の等モル混合試料について、Cl' と Cl のシグナル高比の再現性を検討したところ、変動係数で 15.7% ($n=5$) であり、定量限界は 0.6 μmol 程度であると考えられた。Fig. 1 から分かるように、HA の $\text{C}2''$, $\text{C}6''$ と $\text{C}3''$, $\text{C}5''$ のシグナル強度 (131.5, 129.9 ppm) はほぼ等しく、また Cl', Cl の約 10 倍である。したがって、芳香環のこれらの位置を標識した BA 及び HA が入手できれば、本研究で提唱した方法は 10 倍以上高感度になると考えられる。

^{13}C NMR の S/N 比を向上させるためには、積算時間の制約がある場合、サンプルを濃縮するのが最も効果的である。本研究では、尿を凍結乾燥により 10–20 倍に濃縮した。 ^{13}C 標識体-NMR トレーサー法において、特に

TABLE I. Reproducibility of Ratio (Cl'/Cl) of Signal Intensity

Exp. no.	Integral intensity	Signal height
1	1.051	1.004
2	1.152	1.020
3	1.098	1.010
4	1.076	1.014
5	1.000	0.946
Mean $\pm$ S.D.	1.08 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.03
c.v. (%)	5.2	3.0

Fig. 2. Calibration Graphs for the Determination of ^{13}C -HA-I

^{13}C -HA-II, 2.00 mg. $\square$, signal height; $\blacklozenge$, integral intensity.

TABLE II. Reproducibility of Ratio (Cl'/Cl) of Signal Height in the Presence of Urine Components

Exp. No.	A	B
1	0.233	2.370
2	0.253	2.439
3	0.259	2.381
4	0.247	2.467
5	0.246	2.322
Mean $\pm$ S.D.	0.25 $\pm$ 0.01	2.40 $\pm$ 0.06
c.v. (%)	4.0	2.4

Internal standard (^{13}C -HA-II), 2.00 mg and ^{13}C -HA-I (0.50 mg in A, 4.97 mg in B) were added to 10 ml of natural urine, and the urine was treated as described in the experimental section.

Fig. 3. Partial NMR Spectra of Human Urine after Oral Administration of ^{13}C -BA (100 mg)

The collection period of urine is given at the top. a) urine volume treated for NMR determination. NMR signals of C1 and C1' of HA were obtained at 179.3 and 172.9 ppm, respectively.

サンプルを濃縮した場合に留意しなければならないことは、内因性 ^{13}C 分子による貢献である。そこで、自然尿を 10—20 倍に濃縮し、 ^{13}C NMR を測定した。その結果、本論文の実験条件下では、内因性の馬尿酸その他の物質に起因するシグナルは、172.9 及び 179.3 ppm 付近には見かけ上現れず、本法の障害にならないことが判明した (Fig. 3, blank).

Fig. 2 は尿成分存在下において、 ^{13}C -HA-I、 ^{13}C -HA-II の混合比と C1', C1 の NMR シグナル強度比の関係を検討した結果である。シグナル強度としてシグナル高を用いた場合の相関係数は 0.9998、積分強度を用いた場合のそれは 0.9990 であり、いずれの場合も混合比とシグナル強度比の間に良好な直線関係が成立した。以下の実験では、 ^{13}C -HA-I 量の算出にシグナル高比に基づく検量線を用いた。この

検量線を用いれば、実際に ^{13}C -BA 100 mg をヒトに服用させ、実験の部に記載した方法で尿中に排せつされる ^{13}C -HA-I を定量することが可能であると考えられた。¹⁰⁾ また、 ^{13}C -HA-II 2.00 mg に対し ^{13}C -HA-I 4.97 mg あるいは 0.50 mg を用いた検量線作成用試料を 5 回連続して測定した。その結果、Table II に示したように、変動係数はいずれも 4% 以下であり、本法は臨床化学分析の目的には十分な精度を有していることが明らかとなった。

Fig. 3 は、実験の部に示した方法で処理して得られた、ブランク試料及び ^{13}C -BA 100 mg 服用後 0—2, —4, —6, —8, —12 h の尿試料の NMR である。4 h 以降の尿では ^{13}C -HA-I の存在量が少なかったため、尿 20 ml を分析に用いた。Fig. 2 に示した検量線に従って各時間帯の ^{13}C -HA-I 量を求めることができた。0—2 h 尿から調製し、測定管に入った状態の NMR 試料を、同一条件下日時を変えて測定した結果、 ^{13}C -HA-I/ ^{13}C -HA-II の比は 2.68

Fig. 4. ^{13}C -HA-I Excretion Pattern

±0.068 ($n=3$) であり, 日々間変動は僅少であることが判明した. Fig. 4 に ^{13}C -HA-I 排せつパターンを示した. この被験者では, 服用した BA は速やかに HA へ代謝され, ほぼ定量的に尿中に排せつされることが明らかにされた.

以上, ^{13}C NMR の臨床化学への応用の観点から, ^{13}C 標識体を服用し, 尿中に排せつされた標識代謝産物を ^{13}C NMR で簡便に定量する方法を提案し, その実用性を BA から HA への代謝率の検討によって実証することができた. 本法は, 臨床化学の目的には十分に高い分析精度を有しており, また定量限界は尿 1 ml あたり 75 nmol 程度であった. 今後, 本法は, 測定プローブの大型化, 外部磁場の増強, 標識位置の工夫, 緩和試薬の添加などにより感度向上を計れば, 他の尿成分関連物質のみならず, 薬物の代謝率の測定にも応用可能と考えられる.

謝辞 本研究に際し, 御助言をいただいた東京薬科大学 神藤平三郎助教授に深謝致します.

引用文献

- 1) 第5回 ^{13}C 医学応用研究会 (1989年11月, 新潟) にて発表 (講演要旨集, p. 5).
- 2) 馬場茂雄, 川井邦男, 堀江正信, 志田保夫, 薬誌, **92**, 1569 (1972).
- 3) S. Morishita, S. Baba, Y. Nagase, *J. Pharm. Sci.*, **67**, 757 (1978).
- 4) S. Baba, T. Goromaru, T. Yamazaki, Y. Kasuya, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 1300 (1980).
- 5) Y. Shinohara, S. Baba, Y. Kasuya, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **51**, 1459 (1980).
- 6) T. A. Baillie, *Pharmacological Reviews*, **33**, 81 (1981).
- 7) J. R. Brainard, R. S. Downey, D. M. Bier, R. E. London, *Anal. Biochem.*, **176**, 307 (1989).
- 8) M. Fujino, S. Kobayashi, M. Obayashi, T. Fukuda, S. Shinagawa, O. Nishimura, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 1857 (1974).
- 9) A. W. Ingersoll, S. H. Babcock, "Organic Synthesis," Coll. Vol. II, 1943, p. 328.
- 10) 東 与光, 若尾博美, 馬場茂雄, 堀江正信, 中村 功, 木下寿隆, 三浦溥太郎, 医学のあゆみ, **97**, 707 (1976).