

全自動分析装置による Danazol と その代謝産物の測定

岡山大学医学部産科婦人科学教室 (指導: 関場 香教授)

木 山 智 之

(平成3年11月19日受稿)

Key words: 高速液体クロマトグラフィー, ダナゾール, ダナゾール代謝産物

緒 言

子宮内膜症の治療薬である Danazol (17α -Pregn-4-en-20-yno[2, 3-d]isoxazol-17-ol; DA)は, 卵巣刺激中枢に対して抑制的に働く¹⁾²⁾³⁾ほか, 卵巣や子宮内膜症組織への直接的効果が考えられている⁴⁾⁵⁾が, その作用機序や薬物動態などには不明な点が多い。DA とその代謝産物について Radioimmunoassay 法および高速液体クロマトグラフィー; HPLCによる測定の報告は若干みられる⁶⁾⁷⁾が, 煩雑な操作を必要とするためか, DA あるいはその代謝産物の血清中や腹水中濃度と臨床効果や副作用, さらに作用機序との関連を追求した報告はない。今回, 鈴木らの HPLC を応用した性ステロイドホルモン測定システム⁸⁾を参考に, DA とその代謝産物(Δ^1 -2-Hydroxymethylethisterone; Δ^1 -2-HME, 2-Hydroxymethylethisterone; 2-HME)の自動分析システムを開発し, 子宮内膜症治療のため DA を経口投与した症例について, 血中および腹水中の DA とその代謝産物の濃度の測定をして検討した。

材料と方法

DA, Δ^1 -2-HME, 2-HME の標準品は東京田辺製薬(東京)より提供を受けた。内部標準品; IS には 4'-Methoxyoctanilide ($4 \text{ ng}/\mu\text{l}$ in 10% Ethanol) をエーザイ(東京)より, R2323 をルセルメディカ(東京)より入手した。血液は肘静脈より採取し, 腹水は腹腔鏡あるいは開腹手術時に全量を採取した。これらの試料はフィブリ

ン除去のため凝固促進型試験管(Separapid tube S, セキスイメディカル, 大阪)に約30分静置し, 3000回転/分にて10分間遠沈して上清を分取し, 測定まで -20°C にて冷凍保存した。測定装置への試料注入は, 自動試料注入装置(ASU-420, セキスイメディカル)の試料管に試料 $250 \mu\text{l}$ 入れ, これに IS と蛋白結合型ホルモン遊離のた

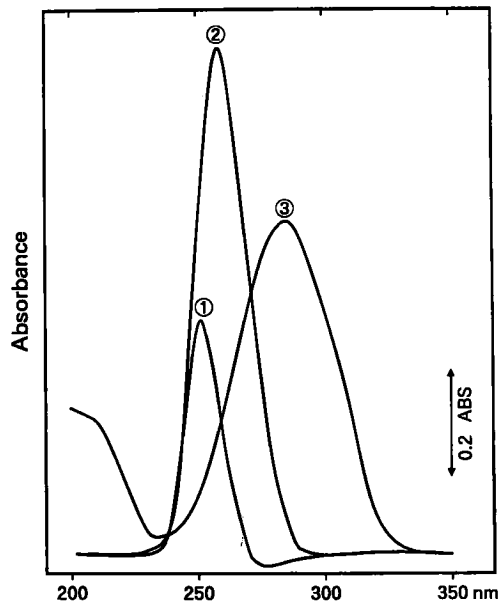


Fig. 1 The ultraviolet absorption spectra of 2-Hydroxymethylethisterone①, Δ^1 -2-Hydroxymethylethisterone ②, Danazol ③ in methanol. Concentrations: 2-Hydroxymethylethisterone, $18.0 \mu\text{g}/\text{ml}$; Δ^1 -2-Hydroxymethylethisterone, $21.5 \mu\text{g}/\text{ml}$; Danazol, $18.0 \mu\text{g}/\text{ml}$.

めの5 α -Dihydrotestosteroneの6%メタノール混合溶解液1150 μ l (IS:0.216ng/ μ l, 5 α -Dihydrotestosterone:12.6ng/ μ l)を添加し、この1400 μ lのうち1000 μ lを前処理系流路に注入した。前処理系には自動前処理装置(オートセラマウト, セキスイメディカル)を使用し、試料中の目的物質を精製水を用いて前処理カラムのセラマウト-25(25 \times 4mm I.D.)に吸着させながら除蛋白・洗浄したのち、この前処理カラムを分析系に組み込んだ。分析系移動相溶媒には磷酸緩衝液(50mM KH₂P04溶液に磷酸を添加してpH3.1に調整)・アセトニトリル・メタノール混合液を流速1.0ml/minで用いた。各物質の保持時間と紫外線吸光特性の検討(Fig. 1)から、DA分析には分析系I(紫外線検出波長282nm, 分析系移動相溶媒容積比:10/11/2)を、 Δ^1 -2-HME, 2-HMEには分析系II(紫外線検出波長254nm, 分析系移動相溶媒容積比:10/7/3)を使用した。前処理カラムより溶出した目的物質をさらに分析カラム(Medipola ODS, 180 \times 4.6mm I.D., セキスイメディカル)により分離溶出させ、紫外線検出器UVD(490型 Waters, Waters, Massachusetts, U.S.A.)

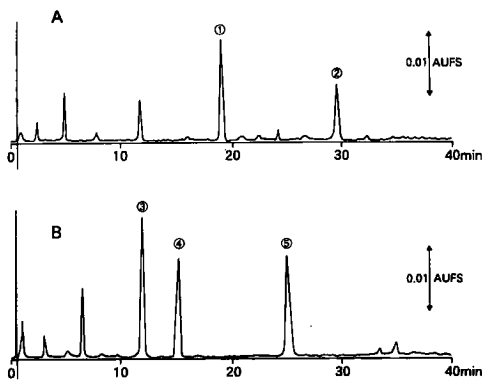


Fig. 2 Chromatograms of the authentic samples of IS (internal standard; 4'-methoxyoctanilide and R 2323) ①, Danazol ②, Δ^1 -2-Hydroxymethylethisterone ③, 2-Hydroxymethylethisterone ④ and IS (R 2323) ⑤ in 250 μ l of serum. Concentrations: Danazol, 100ng/ml; Δ^1 -2-Hydroxymethylethisterone, 100 ng/ml; 2-Hydroxymethylethisterone, 100 ng/ml. A was detected with an ultraviolet detector at 282nm and B, at 254nm.

を用いて一斉分析した。なお、溶出後の前処理カラムは再び前処理系に組み入れ、純水およびメタノールにて洗浄し、次試料の注入にそなえた。このほかの装置としてHPLCポンプ(セキスイメディカル), 溶離液中気泡除去装置(ODU-520, セキスイメディカル), データ処理装置(SIC7000-B, システムインストルメンツ, 東京)を使用した。測定値の算出はピーク高を用いた内部標準法によりおこなった。アセトニトリル, メタノール, 磷酸二水素カリウム, 磷酸は片山化学(大阪)の製品を用いた。なお、血清および腹水の試料は患者に充分説明し、納得してもらった後、採取した。

結 果

Fig. 2に各標準品を添加した婦人血清のクロマトグラムを示す。各標準品の保持時間は、分析系IでIS:18.9分, DA:29.2分, 分析系IIで Δ^1 -2-HME:11.7分, 2-HME:15.3分, IS:25.1分で良好な分離を示し、ブランク血清では一致する保持時間にピークを認めなかった。それぞれの検量線は8-1000ngで良好な直線性を示し、分析系IでのDA, ISおよび分析系II

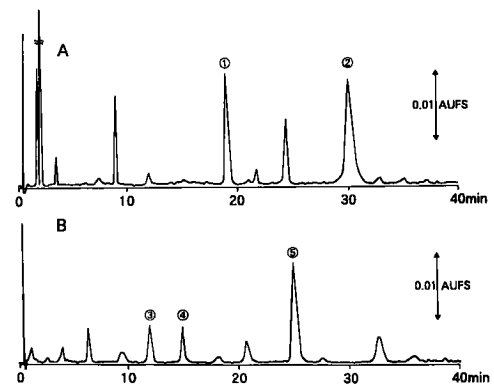


Fig. 3 Chromatograms obtained from 250 μ l of a patient's serum collected 2 h after the oral administration of 200mg of Danazol. ①: IS, ②: Danazol, ③: Δ^1 -2-Hydroxymethylethisterone, ④: 2-Hydroxymethylethisterone, ⑤: IS. A, detected with an ultraviolet detector at 282nm and B, at 254nm.

での Δ^1 -2-HME, 2-HME, IS の平均回収率 (n=6) はそれぞれ85.4%, 75.6%, 94.5%, 95.6%, 82.6%で, また測定間の C.V.値 (n=6) はそれぞれ4.0%, 4.8%, 3.4%, 2.8%, 2.4%と良好であった。この測定法による各標準品の最高検出感度 (S/N ratio=3) はそれぞれ Δ^1 -2-HME: 3.4ng, 2-HME: 3.8ng, DA: 3.6ng であった。

Fig. 3 に DA: 200mg服用 2 時間後の血清250 μ l を本測定法に応用して得られたクロマトグラムを示す。各目的物質の標準品に一致した保持時間に良好な分離を示すピークを認め, これらの血清濃度は Δ^1 -2-HME: 13ng/ml, 2-HME: 18ng/ml, DA: 208ng/mlであった。Danazol: 200mg経口投与例 (n=6) について, 投与前および0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24時間後の DA とその代謝産物の血中濃度を Fig. 4 に

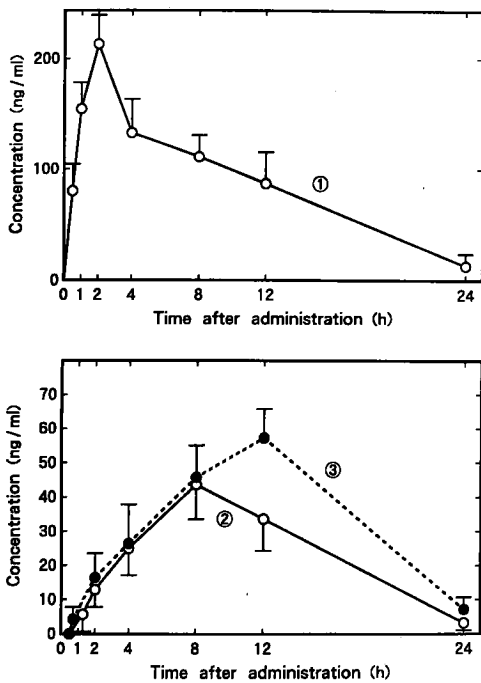


Fig. 4 Chronological changes of mean serum concentrations of Danazol① and its metabolites (Δ^1 -2-Hydroxymethylethisterone ②, 2-Hydroxymethylethisterone③) in 6 patients after oral administration of 200mg of Danazol. mean \pm SD

示す。また, Table 1 に示すように血中最大濃度 (C max, ng/ml), 最大濃度時間 (T max, h), 血中濃度半減期 (T 1/2, h), 血中濃度積算値 (AUC, ng \cdot h/ml), はそれぞれ DA: 201 \pm 16 (mean \pm SD), 2, 7.9 \pm 3.2, 2186 \pm 261, Δ^1 -2-HME: 44 \pm 13, 8, 4.3 \pm 1.8, 497 \pm 129, 2-HME: 58 \pm 11, 12, 4.4 \pm 1.8, 676 \pm 152であった。

次に DA: 400mg/day を16週間投与し, 投与前 (n=8), 投与開始 4 週間 (n=8) \cdot 8 週間 (n=12) \cdot 12週間 (n=8) \cdot 16週間後 (n=7) に採血 (経口投与 2 時間後) して得られた血清

Table 1 Pharmacokinetic parameters of Danazol and two metabolites^a

	Danazol	Δ^1 -2-HME	2-HME
AUC ^{0-24h} (ng \cdot h/ml)	2186 \pm 261	497 \pm 129	676 \pm 152
C max (ng/ml)	208 \pm 16	44 \pm 14	58 \pm 11
T max (h)	2	8	12
T 1/2 (h)	7.9 \pm 3.2	4.3 \pm 1.8	4.4 \pm 1.8

a: Pharmacokinetic parameters of Danazol and two metabolites (Δ^1 -2-Hydroxymethylethisterone, 2-Hydroxymethylethisterone) after oral administration of 200mg of Danazol. Values are expressed as mean \pm SD. Abbreviations: AUC=the area under the serum level curve; C max=maximum concentrations; T max: time of maximum concentration; T 1/2 = half life of elimination. mean \pm SD

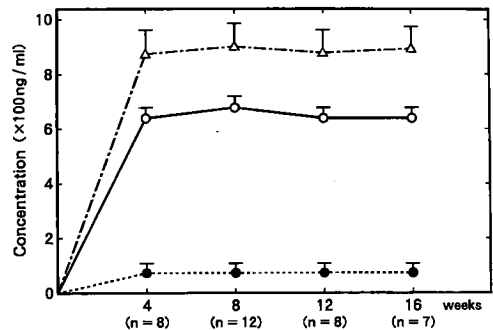


Fig. 5 Serum concentrations of Danazol and two metabolites (Δ^1 -2-Hydroxymethylethisterone, 2-Hydroxymethylethisterone) of 2 hours after oral administration of 200mg of Danazol. Samples were taken every 4 weeks from 7-12 patients treated with 400mg/day of Danazol for 16 weeks. mean \pm SE

Table 2 Serum concentration, ascites concentration and total amount in ascites of Danazol and two metabolites

Sample	amount of ascites (ml)		serum concentration (ng/ml)	ascites concentration (ng/ml)	total amount ^a in ascites (ng)
A	10	DA	248	167	1670
		Δ^1 -2-HME	6	5	50
		2-HME	5	N.D.	—
B	12	DA	160	550	6600
		Δ^1 -2-HME	28	12	144
		2-HME	13	8	96
C	12	DA	125	418	5016
		Δ^1 -2-HME	10	4	48
		2-HME	27	4	48

a : Total amount of Danazol ; DA and two metabolites (Δ^1 -2-Hydroxymethylethisterone ; Δ^1 -2-HME, 2-Hydroxymethylethisterone ; 2-HME) in ascites. A, 2 hours after the oral administration of 200 mg of DA. B, 4 hours. C, 8 hours. N.D. ; no detectable.

について検討した。Fig. 5 にその結果を示すが、DA, Δ^1 -2-HME, 2-HME は服用開始後 4 週間には、それぞれ $842 \pm 126 \text{ ng/ml}$, $54 \pm 16 \text{ ng/ml}$, $605 \pm 102 \text{ ng/ml}$ (mean \pm SE), その後ほぼ一定の濃度で推移していた。

Table 2 に DA : 200mg 投与後 2, 4, 8 時間後の血清と腹水の濃度を測定した結果を示す。DA と Δ^1 -2-HME は投与 2, 4, 8 時間後には腹水中に認められ、2-HME は 2 時間後では測定感度以下であったが、4, 8 時間後腹水中に認められた。各症例の腹水量は 2 時間後、4 時間後、8 時間後の症例でそれぞれ 10ml, 12ml, 12ml で、得られた腹水中の各物質の総重量は Δ^1 -2-HME, 2-HME では少量であったが、DA ではそれぞれ 1670ng, 6600ng, 5016ng であった。

考 察

不妊症とも関係深い子宮内膜症は近年注目され、その病態生理および治療について多くの研究がなされている。子宮内膜症治療薬である DA は、その有効性について多数の報告がなされている³⁾⁹⁾が、当初は中枢抑制作用が主体といわれていた。しかし、その後の研究で中枢抑制作用はそれほど強くなく、estrogen レベルも軽度低下させるだけであることがわかった⁹⁾。それにもかかわら

ず臨床的には有効なのは、子宮内膜症組織に対する直接作用が関与するのではないかとする報告もみられるようになってきている⁴⁾⁵⁾。DA は 17 α -ethinyltestosterone の誘導体であるが、その代謝については動物を使っていくつかの代謝経路が解明されている¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾。Davison らは DA を経口投与されたヒトの尿中には主要代謝産物として 2-HME を確認し、このほか Δ^1 -2-HME, ethisterone を報告している¹¹⁾。また、6 β -OH を有する数種類のステロイドの存在も示唆あり、未同定のものが数多く残されている。また DA の薬物動態についてはヒトにおいて Radioimmunoassay 法を用いた報告があるが¹²⁾¹³⁾、今回の研究では、DA の血中濃度曲線は Radioimmunoassay による Davison や Lloid-Jones らの報告にほぼ一致しており、 Δ^1 -2-HME についてこれまで報告がみられなかったが、two compartment model に一致していることがわかった。副作用については、男性ホルモン作用、体重増加、肝機能障害等が認められる³⁾⁹⁾が、DA およびその代謝産物と血中濃度との関連で述べた報告はなく、今後の課題である。また、腹水中にも比較的速やかに DA および代謝産物が認められることがわかり、これは DA の直接効果に関与しているとも思われる。今回の検討では、

DA は 2 時間後例でも腹水中に認められ、4 時間後、8 時間後には多量に存在していた。血中濃度との関係は腹水量のちがいもあり、濃度の比較は困難であるが、総重量で比較すれば有効性との検討が可能であると思われる。

結 論

今回開発した自動システム測定法により、試料である血清や腹水をそのまま応用して DA とその代謝産物を簡便かつ迅速に測定することができた。そしてこれらの薬物の血中動態および腹水への移行を検討し得た。このシステムによ

る DA とその代謝産物の測定は、臨床的に応用でき、臨床効果や副作用、さらには作用機序を検討するうえできわめて有用であると考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜りました恩師関場 香教授に深甚なる謝意を表します。また終始直接指導いただきました林 伸旨講師に深謝します。

なお、本論文の要旨は第 8 回国際内分泌学会（京都）ならびに第 13 回国際不妊学会（モロッコ）で発表した。

文 献

- 1) Dmowski W, Scholar H, Marhesh V, Greenblatt R : Danazol a synthetic steroid derivative with interesting physiologic properties. *Fertil Steril* (1971) **22**, 9—18.
- 2) Potts GO : Pharmacology of danazol. *J Int Med Res* (1977) Suppl **3**, 1—14.
- 3) Robert L Barbieri, Kenneth J. Ryan : Danazol : Endocrine pharmacology and therapeutic applications. *Am J Obstet Gynecol* (1981) **141**, 453—463.
- 4) Igarashi M : A New Therapy for Pelvic Endometriosis and Uterine Adenomyosis : Local Effect of Vaginal and Intrauterine Danazol Application. *Asia-Oceania J Obstet Gynaecol* (1990) **16**, 1—12.
- 5) 武谷雄二, 水野正彦 : Danazol の子宮内膜組織への直接効果. *産科と婦人科* (1985) **52**, 89—91.
- 6) Peterson JE, King ME, Banks WF, Baker JF, Jensen AF, Ross RW, Clemens S, and Edelson J : Radioimmunoassay for danazol in human and monkey plasma. *J Pharm Sci* (1978) **67**, 1425—1427.
- 7) 保田仁介, 藤井正博, 山木淳子, 本庄英雄, 玉舎輝彦, 岡田弘二 : 高速液体クロマトグラフィーによる血清中 danazol の測定. *京府医大誌* (1983) **92**, 1605—1609.
- 8) Suzuki Y, Hayashi N, Sekiba K : Automated direct assay system for the measurement of sex steroid hormones in serum using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1988) **426**, 33—40.
- 9) 田村昭蔵, 柳 健一, 福田良夫 : 子宮内膜症のホルモン療法—Danazol を中心として—. *産婦人科の実験* (1980) **29**, 1193—1205.
- 10) 常盤知宣 : Danazol のラットにおける吸収, 分布, 排泄および代謝. *応用薬理* (1981) **22**, 605—620.
- 11) Rosi D, Neumann HC, Christiansen RG, Schane HP, Potts GO : Isolation, Synthesis, and Biological Activity of Five Metabolites of Danazol. *J Medicinal Chemistry* (1977) **20**, 349—352.
- 12) Davison C, Banks W and Frits A : The absorption, distribution and metabolic fate of Danazol in rats, monkeys and human volunteers. *Arch Int Pharmacodyn Ther* (1976) **221**, 294—310.
- 13) Lloyd-Jones JG, Labross A, Williams-Ross T, Ross, Jnr RW, Edelson J and Davison C : Danazol Plasma Concentration in Man. *J Int Med Res* (1977) Suppl **3**, 18—24.

**Measurement of Danazol and its metabolites by
automated direct assay system**

Satoshi KIYAMA

Department of Obstetrics and Gynecology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. K. Sekiba)

An automated direct assay system using high performance liquid chromatography was developed for the measurement of Danazol ; DA and its two metabolites, Δ^1 -2-hydroxymethylethisterone (Δ^1 -2-HME), and 2-hydroxymethylethisterone (2-HME), in biological fluid (human serum and ascites). Serum concentrations of these compounds were measured up to 24 h following a single oral administration of 200mg of DA to 6 females with endometriosis. The maximum serum concentration of DA, Δ^1 -2-HME and 2-HME was 208, 44 and 58ng/ml, respectively. The serum half-life of DA, Δ^1 -2-HME and 2-HME was 7.9, 4.3 and 4.4 h, respectively. The mean serum concentration of DA and its two metabolites at the sampling time (2 h after oral administration of 200mg of DA every 4 weeks) hardly changed in the patients administered 400mg/day of DA over a period of 16 weeks. DA and Δ^1 -2-HME were detectable in ascites 2, 4 and 8 h after oral administration of 200mg of DA, and 2-HME was detectable in ascites at 4 and 8 h. This system could quantify DA and its metabolites easily and simultaneously, and was considered to be valuable in the studies on the relationship between the pharmaco-kinetics and the clinical effects of DA.