

博士(医学) 長谷川 弘太郎

## 論文題目

Simultaneous analysis of sildenafil, vardenafil, tadalafil and their desalkyl metabolites in human whole blood and urine by isotope dilution LC-MS-MS

(液体クロマトグラフータンデム質量分析計を用いた、安定同位体希釈法によるヒト全血、尿からのシルデナフィル、バルデナフィル、タダラフィルとその脱アルキル化代謝物の一斉分析)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

司法解剖の目的は第一に死因を究明することである。死因と言っても、それに至る様々な要因が作用している場合が多く、単純ではない。我々が経験する法医解剖例では、死因として心疾患類として結論づける事例が少なくない。

近年、erectile dysfunction (ED) 改善薬であるシルデナフィルやそのファミリー薬物が広く使用されている。これらシルデナフィル類は PDE type5 阻害効果により cGMP 系を介すことで脈管の拡張をもたらす。この過程で心血管系疾患発症のリスクを増加させる薬物として心疾患を有する患者に使用することが禁忌とされている。そのため、ED 改善薬を服用しなければ死に至らない軽度な心疾患事例も多く存在することも容易に考えられ、解剖試料からの ED 改善薬の定量の必要性が高まっている。さらに、これらシルデナフィル類は薬品名を記載される事なく、ある種の製剤や健康食品にも含まれる事が報告されており、インターネットを介した流通も多く行われているため、国民の健康に対する潜在的な脅威ともなっている。

これまでに、食品や製剤、ヒト体液や尿からシルデナフィル類とその代謝物を個々に検出、測定を行った報告はあるが、LC-MS-MS によるヒト全血・尿からのシルデナフィルファミリーとその代謝物を一斉分析、さらに安定同位体の内部標準物質としての使用による精密測定を行った研究は報告されていない。また、固相抽出法による簡便且つ高感度検出をもたらす新しい試料処理法の開発も併せて行った。

[材料と方法]

シルデナフィル、バルデナフィルならびにタダラフィルを代表的な ED 改善薬として選定し、主な代謝産物である *N*-desmethyl sildenafil, *N*-desethyl vardenafil とこれらの物質全ての安定同位体(内部標準、IS) を実験試薬として購入した。

試料の前処理に用いる固相抽出カラムは一般的な薬剤の抽出に用いられる Oasis HLB、Bond Elut C18、Focus 等の疎水性固相のカラムを比較検討のため複数種類購入した。

測定と試料の前処理法の開発に用いるヒト全血 (5~10cc) と尿は、測定対象薬物を服薬していないことを確認した健康ボランティア (20~60 歳代男性、40~60 歳代女性ら計 4 名) より、説明と同意の上提供を得た。また、実際にクエン酸シルデナフィル製剤を服用しての血中・尿中薬物推移の検討にあたっては、同じく同意を得た健康ボランティア (60 歳代男性、20 歳代男性、計 2 名)

による通常使用量程度 (25 mg 錠剤 1 錠) を経口服用前後、採血と採尿を施行した。なお、本人体験は本学倫理委員会にて承認を受けている。

先に述べた実験試薬をメタノール溶液として一定量ヒト全血・尿に添加したのち、各種固相抽出カラムに導入し洗浄溶媒や溶出溶媒・濃縮法について、回収率や再現性、マトリックス効果と併せ比較検討を行った。

対象物質の分離および測定には Agilent LC 1200 Series 液体クロマトグラフと 6460 Triple Quad LC/MS tandem 質量分析計を用い定量・定性分析を行うこととした。基礎データとなる液体クロマトグラム、マススペクトラムとその最適分析パラメータを得た。併せて、LC の分離カラムと移動相の検討も行った。結果、分離カラムは ZORBAX Extend-C18 カラム (75×4.6mm i.d., 粒径 3.5µm, Agilent) を用いることとした。

#### [結果と考察]

複数種類の固相抽出カラムを検討した結果、Oasis HLB カラムを用いた固相抽出により全血、尿からシルデナフィル、バルデナフィル、タダラフィル、*N*-desmethyl sildenafil, *N*-desethyl vardenafil およびそれらの安定同位体を一斉に回収することができ、かついずれの濃度 (1 ~ 100 ng/ml) でも良好な回収率 (80.7 ~ 127%)、再現性 (%CV < 20%, accuracy < 15%) を得た。加えて、LC-MS-MS 分析において multiple reaction monitoring (MRM) クロマトグラム上でのブランク検体のバックグラウンド信号の検討では、測定対象物質の出現部位に著明な妨害ピーク等を認めず、前処理法の選択性においても良好なことが確認できた。

各化合物の安定同位体を用いた内部標準法による MRM 定量分析を行い、一般的な治療濃度下限以下までの定量限界値 (< 1 ng/ml, S/N > 10) と、検出限界値 (< 0.05 ng/ml, S/N > 3) を得た。併せて高濃度領域までの検量線の直線性の検討を行い、その全領域に渡って直線性を確認した ( $r > 0.99$ )。

定量結果に影響を及ぼし得るマトリックス効果については、抑制効果、促進効果いずれも著明でなく、マトリックス (ヒト全血・尿) による重大な影響を認めなかった。

実際に健常ボランティアによるクエン酸シルデナフィル製剤の服用後の血中・尿中薬物推移の検討では、血液、尿いずれからもシルデナフィル、シルデナフィル代謝物の検出・測定が、服用後少なくとも 6 時間に渡り可能であった。

#### [結論]

新たに開発した試料処理法によってヒト全血・尿からのシルデナフィル類とその代謝物の LC-MS-MS による一斉分析を確立し、安定同位体の使用による精密測定を試み、良好な定量性と検出感度、再現性を得た。今回の研究で確立した方法は今迄報告されたものより高感度である。しかもすべての対象薬物の安定同位体を IS として用いているため、例えマトリックス効果が存在する試料についても心配することなく、確実な定量を行うことができる。本法はさらに実質臓器や押収商品中のシルデナフィル類の検出・同定・定量に利用でき、法医学・法中毒学分野での利用価値は高いものと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

近年、erectile dysfunction(ED)改善薬であるシルデナフィルやそのファミリー薬物が広く使用されている。これらシルデナフィル類は脈管の拡張をもたらす事で心血管系疾患発症のリスクを増加させるため、特に法医解剖の試料の ED 改善薬の分析の必要性が示唆されている。これ迄液体クロマトグラフ - タンデム質量分析計(LC-MS-MS)によるヒト全血・尿からのシルデナフィル類とその代謝物の安定同位体希釈法による一斉分析を行った研究は報告されていない。申請者は代表的な ED 改善薬としてシルデナフィル、バルデナフィル、タダラフィル、主な代謝産物である *N*-desmethyl sildenafil、*N*-desethyl vardenafil を選定し、前処理法と重水素安定同位体を内部標準に用いた LC-MS-MS での一斉分析法を開発した。

検討の結果 Oasis HLB カラムを用いた固相抽出により全血・尿からかなり精製された対象物質を一斉に回収することができた。回収率はいずれも 80.3%以上と良好であった。本法では重水素安定同位体を用いて所謂マトリックス効果を打ち消し、更にそれがキャリアとして働き試料中からの目的物質の抽出効率を上げている。併せて定量分析のための検量線を作成し、良好な直線性を確認した。内部標準法による定量分析では治療濃度下限以下までの検出・定量限界値を得た。

申請者は本研究により安定同位体希釈法によるヒト全血・尿からのシルデナフィル類とその代謝物の一斉分析方法と固相抽出による試料処理法を確立した。今迄に個々の物質のいくつかについて、LC-MS-MS での検出法の論文が発表されているが、それらよりもかなり高感度の分析法を確立している。本法の法医学・法中毒学分野での利用価値は高いものと思われる。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 瀬藤 光利  
副査 藤本 忠蔵 副査 渡邊 裕司