

学 位 論 文 要 旨

平成29年7月26日

学位申請者
(田中 正彦) 印

学位論文題目

エダラボン水溶液の安定化剤とその作用機序

Stabilizers for aqueous solution of edaravone and their action mechanisms

学位論文の要旨

エダラボン(3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one)はフリーラジカルを消去する世界初の脳保護薬として脳梗塞急性期を適応に 2001 年に日本で承認された。その後、神経難病である筋萎縮性側索硬化症(ALS)の適応が 2015 年に日本で、2017 年に米国で承認された。エダラボンは点滴静注で投与され、エダラボン 30 mg が含有される 1 管 20 mL のアンプルと 1 袋 100 mL のバッグが存在する。

特許文献によると、エダラボンは水溶液中で酸化を受けるため、注射剤の設計に際し抗酸化剤の検討がなされ、亜硫酸塩とシステイン類の組み合わせが選択された。

なお、当該製剤の安定性試験において、微量ながら発がん性が疑われているフェニルヒドラジンの出現が認められたが、フェニルヒドラジンの暴露許容濃度を最も厳しく設定している米国産業衛生専門家会議の許容暴露量を下回ることより、当該製剤によるフェニルヒドラジン摂取に伴う発がんリスクの増加はないものと判断されている。

さらに、米国 FDA が ALS の承認を公表した際、亜硫酸水素ナトリウムは生命を脅かしかねないアナフィラキシー症状の原因になるかもしれないと記述している。

上記の問題点を踏まえ、かつ ALS の承認により、より長期間に亘る反復投与がなされることから、エダラボン水溶液の安定性を確実に維持できる、より優れた添加物の開発が必要と考えた。

エダラボンは固体では安定だが、水溶液中ではエノール型とエダラボンアニオンとして存在するため不安定である。

エダラボン水溶液の安定性改善には、低 pH と脱酸素が確立した方法であり、さらに、亜硫酸水素ナトリウムとシステインが安定化剤として使われているが、明確なメカニズムは明らかにされていない。

本学位論文は、第 1 章「緒言」の後、第 2 章「亜硫酸水素ナトリウム」、第 3 章「グルタチオン」、第 4 章「結語」で構成した。

第 2 章「亜硫酸水素ナトリウム」

2-3-1 亜硫酸水素ナトリウム添加によるエダラボンの安定化効果の検討

市販製剤に準拠したエダラボン 30 mg, 亜硫酸水素ナトリウム 20 mg を単独または混和して全量 20 mL に調製し、空気雰囲気下のまま、60 °C で保存し、エダラボン濃度、着色、不

溶性異物を経時的に観察した。

亜硫酸水素ナトリウムの添加効果は、エダラボン濃度で数%上回ったが、着色、不溶性異物を減弱したものの出現を抑えることは出来なかった。

後述する NMR 測定に供したサンプルに準じた、溶媒を DMSO/水=10/90 とした場合も同様の結果だった。

2-3-2 不溶性異物の分析

不溶性異物を HPLC で分析した結果、2 つの化合物が存在し、TOFMS 分析の結果、エダラボンとエダラボントリマーと同定した。

エダラボントリマーの生成機序は次の如くである。

2 分子のエダラボンラジカル→エダラボンダイマー→エノール化→共役エダラボンダイマー→エダラボンダイマーラジカル→エダラボンラジカルとエダラボンダイマーラジカルがカップリング→エダラボントリマー

この反応は無酸素下で起こる反応であること、エダラボンダイマーの生成量はエダラボントリマーと比べるととても少ないこと、これはエダラボンダイマーがエダラボンより反応性が高いことに起因すること、が注目すべき点であった。

2-3-3 NMR によるエダラボンと亜硫酸水素ナトリウムの相互作用の検討

CDCl_3 中のエダラボンの ^{13}C NMR スペクトラムはケト型を支持した。

溶媒を DMSO- d_6 /D $_2$ O = 10/90 に変えると、スペクトラムは劇的に変化し、ケミカルシフトは消失、移動、分割し、エダラボンは水中で少なくとも 2 つの異なる構造を有し、ケト型に加えてエノール型が最も考え得ると判断した。

亜硫酸水素ナトリウムを添加すると、 ^{13}C NMR スペクトラムは、カルボニルと反応した亜硫酸付加体の存在を示し、アミン型が支配的であることを示した。

2-3-4 HPLC によるエダラボンと亜硫酸水素ナトリウムの付加体の検出

aminopropylsilyl column (LCNH $_2$) は表面にカチオンを保持するので、エダラボンアニオンとの相互作用が強いため、保持時間の長いピークがエダラボンアニオンであり、保持時間の短いピークが非イオン型のエダラボンである。亜硫酸水素ナトリウム添加後のクロマトグラムでは、両ピークは減少し、新たな 2 つのピークが増加した。すなわち、亜硫酸水素ナトリウム添加により非イオン型エダラボンが減少し、2 つのイオン型亜硫酸付加体が増加したと解釈できる。

2-4. まとめ

エダラボンは水溶液中で、エダラボンアニオンとして存在し、電子供与後にエダラボンラジカルとなる。エダラボンラジカルは分解物の前駆体になる。従って、エダラボンの安定性を改善するためには、エダラボンアニオンの濃度を下げる必要がある。

亜硫酸水素ナトリウムのエダラボン水溶液の安定化効果を検討した結果、安定化に有効であることは観察したが、エダラボン分解物の抑制は不完全であった。

そして、 ^{13}C NMR と HPLC の検討からエダラボンの亜硫酸付加体の形成が示され、それは平衡を付加体側に動かすと共に、エダラボンアニオンを減少させることを示した。

第 3 章 グルタチオン

3-3-1 グルタチオン添加によるエダラボンの安定化効果(1)

市販製剤に準拠したエダラボン 30 mg, 亜硫酸水素ナトリウム 20 mg, システイン 10 mg 及びグルタチオン 25.4 mg (システインとモル濃度を揃えた) を単独または混和して全量 20 mL に調製し、空気雰囲気下のまま、60 °C で保存し、エダラボン濃度、着色、不溶性異物を経時的に観察した。

結果、システインの添加効果はなく、エダラボン単独と同程度の本化合物の濃度低下、着色、不溶性異物の出現を認めた。エダラボンに亜硫酸水素ナトリウムを加えたサンプルには僅かな添加効果があった。エダラボンにグルタチオンを添加することにより、エダラボンの濃度低下はエダラボン+亜硫酸水素ナトリウム+グルタチオンと同程度であり、着色及び不溶性異物の程度はエダラボン単独、エダラボン+亜硫酸水素ナトリウム、エダラボン+システインより優れていた。

3-3-2 グルタチオン添加によるエダラボンの安定化効果(2)

市販製剤処方に準拠して、エダラボン 30 mg 及び亜硫酸水素ナトリウム 20 mg を基盤に、システイン及びグルタチオンを組み合わせ、液量 20 mL のサンプルを調製し、60 °C 及び室温で保存、観察した。結果は次の如くであった。

システインの添加効果は僅かであり、エダラボン+亜硫酸水素ナトリウム及びエダラボン+亜硫酸水素ナトリウム+システインではエダラボンの濃度低下と不溶性異物の出現を認めた。エダラボン+亜硫酸水素ナトリウム+グルタチオンでは本化合物の濃度低下は僅か又はなく、不溶性異物は出現しなかった。

3-3-3 微量不純物フェニルヒドラジン生成に対するグルタチオン添加効果

エダラボン+亜硫酸水素ナトリウム+グルタチオンではフェニルヒドラジンは出現しなかったが、エダラボン+亜硫酸水素ナトリウム及びエダラボン+亜硫酸水素ナトリウム+システインの 60 °C、5週間保存ではフェニルヒドラジンが、各々 5.6 µM 及び 1.9 µM 出現した。

3-3-4 エダラボン水溶液の安定化でのグルタチオンの役割

グルタチオンはエダラボンアニオンの代わりに酸素に電子を与えている可能性があり、そのためには、グルタチオンとエダラボンアニオンが分子間水素結合によってお互いに近付いている必要がある。グルタチオン(GSH)から電子を与えるので、グルタチオンラジカル(GS•)となり、さらに酸化型グルタチオン(GSSG)となることが予測される。実際に GSSG の生成を確認した。一方、システインは分子内水素結合が優勢なためにエダラボンの安定化に寄与しないと考察された。

3-3-5 亜硫酸水素ナトリウムを用いないエダラボン水溶液—グルタチオン添加及び脱酸素(窒素置換)による安定化効果の検討(1)

グルタチオンと亜硫酸水素ナトリウムの組み合わせがエダラボン水溶液の安定化剤として最も効果的であることが示された。しかし、FDA による亜硫酸水素ナトリウムの使用についての最近の注意喚起は、亜硫酸水素ナトリウムを用いない系の迅速な確立を求めており、グルタチオンと脱酸素の組み合わせを鋭意検討した。

エダラボン水溶液に、+亜硫酸水素ナトリウム+システイン(空気雰囲気下)、+亜硫酸水素ナトリウム+グルタチオン(空気雰囲気下)、+グルタチオン(窒素置換)、+グルタチオン(空気雰囲気下)で、60 °C、4週間保存し、比較を行った。

グルタチオンと脱酸素を組み合わせた結果は明確で、不溶性異物の生成は無く、エダラボン残存量は最高値であり、更に、フェニルヒドラジンも生成しなかった。

3-3-6 亜硫酸水素ナトリウムを用いないエダラボン水溶液—グルタチオン添加及び脱酸素(窒素置換)による安定化効果の検討(2)

エダラボン+グルタチオン(窒素置換)、エダラボン+亜硫酸水素ナトリウム+グルタチオン(空気雰囲気下)、エダラボン+グルタチオン(空気雰囲気下)のサンプルを各々 n = 3 調製し、60 °C、4週間保存し、比較を行った。

グルタチオンと脱酸素を組み合わせた結果は明確で、着色と不溶性異物の生成は無く、エダラボン残存濃度は他と比べて最高値であった。

3-3-7 亜硫酸水素ナトリウムを用いないエダラボン水溶液ーグルタチオン添加及び脱酸素(窒素置換)による安定化効果の検討(3)

エダラボン(窒素置換), エダラボン+グルタチオン(窒素置換)のサンプルを各々n = 3 調製した。エダラボンは 8.61 mM, グルタチオンは 0.86 mM(エダラボンの 1/10 モル濃度) ~ 8.61 mM(エダラボンと等モル濃度)とし, 60 °C, 4 週間保存し, 比較を行った。

エダラボン単独の窒素置換では不溶性異物の生成が認められたが, グルタチオン存在下の窒素置換では不溶性異物の生成は無かった。エダラボンのモル濃度の 1/10 程度のグルタチオン添加と窒素置換を組み合わせることで, 安定なエダラボン水溶液が得られることが明らかとなった。

3-4 まとめ

空気雰囲気下ではシステインは単独添加ではもとより, 亜硫酸水素ナトリウムとシステインを共存させても, エダラボンの安定化作用を示さなかった。

グルタチオンは単独添加でも, 亜硫酸水素ナトリウムとグルタチオンを共存させた場合に近い安定化効果を示し, 有益な安定化剤であることを見出した。

その作用機序として, エダラボンアニオンを安定化させるために, SH 基が関与した水素結合の形成が考え得る。

グルタチオンはエダラボンアニオンと分子間で SH 基が関与した水素結合を作り, 7 員環を形成し安定化する。加えて, 電子供与の際は, エダラボンアニオンから電子を与えるのではなく, グルタチオンから電子を与えることができる。

一方, システインは, エダラボンとの分子間水素結合より, 分子内水素結合が優勢である。システインはエダラボンの安定化に積極的に寄与しなかった実験結果と一致する。

FDA による亜硫酸水素ナトリウムの使用についての最近の注意喚起を踏まえて, グルタチオンと脱酸素の組み合わせを鋭意検討し, その結果は明確で, 不溶性異物の生成は無く, エダラボン濃度は高値であり, フェニルヒドラジンも生成しなかった。

第4章 結語

エダラボン水溶液の安定化剤として亜硫酸水素ナトリウム及びグルタチオンをとりあげ, さらにその作用機序について検討した。

亜硫酸水素ナトリウムのエダラボン水溶液の安定化効果を検討した結果, 安定化に有効であることは示したが, エダラボン分解物の抑制は不完全であった。¹³C NMR と HPLC の検討からエダラボンの亜硫酸付加体の形成が示され, そのことは平衡を安定側に動かすと共に, エダラボンアニオンを減少させることを示した。

次に, チオール(SH)基を有するグルタチオンに着目して, システインと対比し安定化効果を検討した。空気雰囲気下ではシステインの単独添加はエダラボンの安定化作用を示さず, 一方, グルタチオンがシステインを凌駕する性能を有することを見出すと共に, その作用はエダラボンアニオンと SH 基が関与した分子間水素結合に基づくものであることを考察した。

グルタチオンは亜硫酸水素ナトリウムと共存させた場合に強力なエダラボン安定化作用を示し, その組み合わせはエダラボン水溶液を空気雰囲気下にも関わらず, 室温で 1 年間以上安定化した。また, グルタチオンはエダラボン水溶液の 60 °C, 4 週間保存での安定性を維持し, 潜在的発がん性物質であるフェニルヒドラジンの生成を抑制したが, 一方, システインにはその作用は無かった。

米国 FDA は最近, 亜硫酸水素ナトリウムはこれに鋭敏な人では生命を脅かしかねないアナフィラキシー症状を引き起こす可能性があるとして指摘している。そこで, グルタチオン単独添加でも, 亜硫酸水素ナトリウムと共存させた場合に近い安定化作用を示したことから, 脱酸素の組み合わせを鋭意検討し, グルタチオンと亜硫酸水素ナトリウムの組み合わせ以上に, エダラボン水溶液を安定化することを見出した。

以上、本論文はエダラボン水溶液を安定化させる機構について分子レベルで考察し、亜硫酸水素ナトリウムとグルタチオンの作用機構の特徴を初めて明らかにした。そして実用的に有用なグルタチオンと脱酸素による安定化法を確立した。これらの知見はエダラボン製剤のさらなる安定化に貢献できるものと期待される。