

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659087

研究課題名(和文)有機化学のエビデンスに基づく医薬品投与時の配合変化の予測

研究課題名(英文)Prediction of the drug incompatibility based on the evidence of organic chemistry

研究代表者

板垣 文雄 (ITAGAKI, Fumio)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：70563906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：メロペネム水和物(MEPM)とアミノ酸輸液製剤を混合すると経時的にMEPMの残存率が低下することが知られている。この配合変化はアミノ酸輸液製剤に含まれるL-システイン(L-Cys)が、MEPMのβ-ラクタム環を求核攻撃することに起因すると推測できる。MEPMとL-Cysの配合変化試験により、L-CysがMEPM注射液とアミノ酸輸液製剤の配合変化を引き起こす主な原因であると特定した。

研究成果の概要(英文)：It is well known that after meropenem hydrate (MEPM) injection and amino acid infusions are mixed, the MEPM residual ratio sequentially decreases. This incompatibility is probably due to the nucleophilic attack to the beta-lactam ring of MEPM by L-cysteine (L-Cys) present in the amino acid infusion. Through the MEPM and L-Cys incompatibility test, L-Cys has been identified as the main cause of incompatibility between MEPM injection and amino acid infusions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：配合変化 有機化学 メロペネム β-ラクタム系抗生物質 L-システイン SH基 求核置換反応 細胞障害性

### 1. 研究開始当初の背景

医薬品の配合変化を科学的な裏付けをもって予測し、未然に防ぐことは、医薬品の適正使用をすすめるうえで薬剤師の重要な責務である。従来からの医薬品の配合変化の予測は、主に pH 変化に伴う溶解度変化を対象とした物理的配合変化を中心に検討され、医療現場に適用されてきた。しかし、この方法は、注射剤に酸またはアルカリを添加して pH を変動させたときにみられる沈殿や着色などの外観変化の観察に基づいた予測法であるため、目にみえない医薬品の分解などは予測できない。

医薬品の化学的特性は、その化学構造に由来するため、もし化学構造から配合変化を予測できれば、有益性は非常に大きいと考えられる。しかしながら、注射薬の配合変化を有機化学反応ととらえて、化学構造の骨格や官能基から配合変化の予測を試みた研究は、国内外においてほぼ皆無であった。

### 2. 研究の目的

臨床現場で生じる配合変化について、有機化学反応の視点から解明することを試みた。得られる知見より、有機化学のエビデンスに基づく新しい配合変化の予測の方法論を確立して、治療上問題となる医薬品の分解や新たに生じる反応生成物による健康被害を未然に防ぐことを目指した。

本研究では、(1) メロペネム水和物 (MEPM) と L-システイン (L-Cys) を含有するアミノ酸輸液製剤の配合変化の予測に関する検討、(2) MEPM と類似の骨格を有する β-ラクタム系抗生物質の配合変化に関する検討、(3) L-Cys に含まれる官能基であるスルファニル基 (SH 基) を有する医薬品の配合変化に関する検討、を行った。さらに、(4) 培養細胞を用いて配合変化による生成物の毒性評価を試みた。

### 3. 研究の方法

(1) MEPM と L-Cys を含有するアミノ酸輸液製剤の配合変化に関する検討

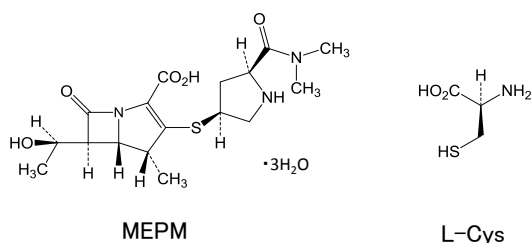


図1. MEPM と L-Cys の化学構造

MEPM とアミノ酸輸液製剤を混合すると経時的に MEPM の残存率が低下することが知られている。この配合変化の要因を有機化学反応の視点から考察し、アミノ酸輸液製剤の成分である L-Cys の SH 基が高い求核性により、MEPM の β-ラクタム環と開環反応を引き起こす可能性が高いと考えた (図1)。また、SH 基はアルカリ条件下で S 原子上の電子密度が高くなると求核性が増すため、その反応性は pH 条件に影響されると推測した。

アミノ酸輸液製剤中での MEPM の安定性に及ぼす要因を明らかにし、臨床現場で MEPM の残存率の算出が可能な方法を確立して、MEPM の使用の可否を判断できるようにするために、① pH 4~8 における MEPM と L-Cys の配合変化試験、② 注射用 MEPM (MEPM と添加物) とアミノ酸輸液製剤 18 品目の配合変化試験、③ MEPM と L-Cys の反応速度から注射用 MEPM とアミノ酸輸液製剤の配合時の MEPM 残存率を予測し、実測残存率との比較、を行った。

(2) 他の β-ラクタム系抗生物質と L-Cys の配合変化に関する検討

L-Cys の SH 基は高い求核性を有するため、MEPM と類似の骨格を有する β-ラクタム系抗生物質と混合した場合においても、MEPM と同様に β-ラクタム環の開環反応を引き起こすと推測した。β-ラクタム系抗生物質のドリペネム (DRPM)、ピアペネム (BIPM)、ベンジルペニシリン (PCG)、セフトリアキソン (CTRX) およびセフメタゾール (CMZ) について、各種 pH 条件下において L-Cys 混合時の安定性試験を行った。

(3) MEPM と他の SH 基を有する医薬品の配合変化に関する検討

L-Cys 以外に SH 基を有する医薬品についても、L-Cys と同様に MEPM との化学反応が起こる可能性があると考え、SH 基を有する医薬品 3 種 (グルタチオン、メスナ、チアマゾール) が MEPM の安定性に及ぼす影響について検証した。

(4) 培養細胞を用いた配合変化による生成物の毒性評価の試み

配合変化による生成物の毒性を評価するために、培養細胞を用いて細胞生存率を指標とした評価系の構築をすすめた。β-ラクタム系抗生物質と L-Cys の配合変化生成物における細胞生存率への影響について、マウスリンパ腫由来 EL4 細胞を用いて検討した。また、β-ラクタム系抗生物質と L-Cys の配合変化物にテトラゾリウム塩を添加するとホルマザンの沈殿が生じ、活性酸素の発生が示唆されたため、SOD またはカタラーゼを用いて生じる活性酸素種を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) MEPM と L-Cys を含有するアミノ酸輸液製剤の配合変化に関する検討

###### ① MEPM と L-Cys の配合変化試験

MEPM 単独 (対照群) では、pH 4.0 においては 24 時間後の MEPM 残存力価が 80 % にまで低下したが、pH 5.0~8.0 においては 24 時間後の残存力価は 90% 以上であり安定であった。MEPM と L-Cys の混合では、経時的な MEPM の分解反応がみられた (図 2)。30 分後の MEPM の残存率は、pH 4.0、pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0 および pH 8.0 において、それぞれ 98%、93%、66%、26%、8% であり、pH が高値になるにつれて著しい MEPM の分解がみられた。

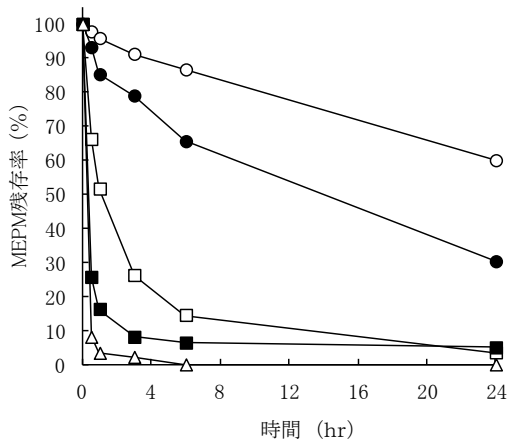


図 2. pH 4~8 における MEPM と L-Cys の配合変化試験

○ : pH 4, ● : pH 5, □ : pH 6, ■ : pH 7, △ : pH 8

初期濃度 : MEPM 5.7 mM, L-Cys 5.7 mM

積分速度式に伴うプロットでは、MEPM 残存率の逆数は反応時間に対して直線関係にあることから 2 次反応であることが判明となり、直線の傾きから各 pH における L-Cys による MEPM 分解反応の 2 次反応速度定数  $k_2$  を求めた。その結果、pH 4~8 では pH が高値になるにつれて、 $k_2$  が大きくなる傾向がみられた。また、pH と  $k_2$  の対数の間には直線関係が認められた (図 3)。

L-Cys による MEPM 分解の機序として、我々は分解物を単離・精製して機器分析により構造を解析することにより、L-Cys の SH 基が MEPM の  $\beta$ -ラクタム環を求核攻撃する反応を引き金として生じる複数の反応生成体を見出している。

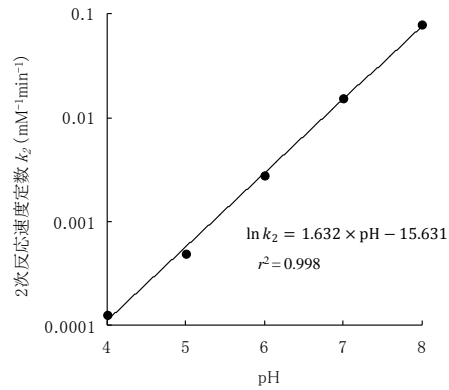


図 3. MEPM と L-Cys の反応における pH と 2 次反応速度定数の関係

初期濃度 : MEPM 5.7 mM, L-Cys 5.7 mM, 温度条件 : 室温 25 °C

###### ② 注射用 MEPM とアミノ酸輸液製剤の配合変化試験

注射用 MEPM (MEPM と添加物) とアミノ酸輸液製剤 18 品目の配合変化試験を実施した結果、MEPM の残存率にはアミノ酸輸液製剤により大きなばらつきがみられた (10 分後; 30%~100%、30 分後; 14%~100%)。高濃度の L-Cys を含むプレアミン-P、キドミン、アミパレンでは混合 30 分後においてそれぞれ 14%、36%、35%と著しい MEPM の分解がみられた。L-Cys 濃度が高くなるにつれて 30 分後の残存率が低値になる傾向がみられ、また L-Cys 濃度が等しい場合は、pH が高い製剤で残存率がより低い傾向がみられた。L-Cys を含まないプラスアミノや、L-Cys の代わりに N-アセチルシステインが配合された製剤 (ネオパレン 1 号・2 号、ビーフリード) では、30 分後の MEPM 残存率は 95% 以上であり、ほとんど MEPM の分解はみられなかった。

###### ③ 注射用 MEPM とアミノ酸輸液製剤の配合変化予測

配合変化が L-Cys 以外の有効成分や製剤の添加物の影響ではないことを確認するために、注射用 MEPM とアミノ酸輸液製剤の配合変化が L-Cys のみに起因すると仮定して、MEPM と L-Cys の反応速度から注射用 MEPM とアミノ酸輸液製剤の混合 10 分後および混合 30 分後の MEPM の残存率の予測を試みた。その結果、算出された MEPM 予測残存率と MEPM 実測残存率の間で 10 分後、30 分後のいずれでも強い相関関係がみられた (10 分後;  $r^2=0.985$ , RMSE 5.44%、30 分後;  $r^2=0.986$ , RMSE 4.55%) (図 4)。すなわち、注射用 MEPM とアミノ酸輸液製剤の配合変化における MEPM 残存率の予測精度は良好であり、注射用 MEPM とアミノ酸輸液製剤の配合変化の主な原因は L-Cys であると特定できた。また、反応速度論により導いた配合変化の予測式により、MEPM の残存率を予測することが可能であった。

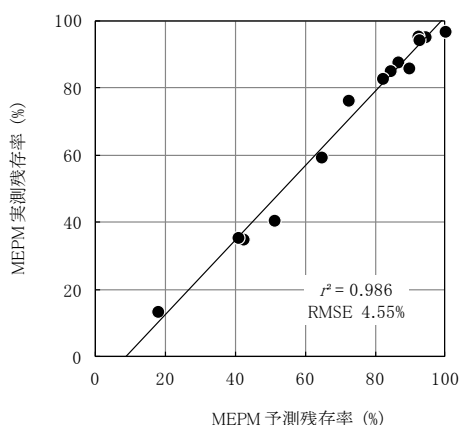


図 4. 注射用 MEPM とアミノ酸輸液製剤を配合 30 分後における MEPM 予測残存率と MEPM 実測残存率の関係

### (2) 他のβ-ラクタム系抗生物質と L-Cys の配合変化に関する検討

DRPM、BIPM、PCG、CTRX および CMZ の単独時では、いずれの pH でも 60 分後まで残存率 90% 以上を保ち安定であった。これらの抗生物質と L-Cys 混合時では、ペニシリン系抗生物質である PCG とカルバペネム系抗生物質である DRPM、BIPM において pH の増大に依存した残存率の著明な低下がみられた。なお、DRPM、BIPM は 2 次反応に適合したが、PCG は適合しなかった。一方、セフェム系抗生物質である CTRX、CMZ と L-Cys の混合時では残存力価の低下はほとんどみられなかった。これらのことから、全てのβ-ラクタム系抗生物質で MEPM と同様に L-Cys との反応が起こるのではなく、β-ラクタム環に隣接する構造や側鎖による立体障害などによって反応性に違いが生じると考えられる。

### (3) MEPM と他の SH 基を有する医薬品の配合変化に関する検討

混合後 60 分後における MEPM の残存率は、MEPM 単独時では 99%、グルタチオン、メスナ、チアマゾールとの混合時では、それぞれ 93%、96%、99% であり、いずれも 90% 以上を保っていた。しかし、混合後 24 時間後における MEPM の残存率は、MEPM 単独時では 88% であったのに対して、グルタチオンとの混合時では 27% と MEPM のより顕著な分解がみられた。一方で、メスナ、チアマゾールとの混合時では、それぞれ 74%、89% であった。これらのことから、SH 基を有する医薬品の全てで L-Cys のような求核反応が起こるのではなく、各々の化学構造等によって反応性に違いが生じると考えられる。

### (4) 培養細胞を用いた配合変化による生成物の毒性評価の試み

β-ラクタム系抗生物質と L-Cys の配合変化生成物における細胞生存率への影響について、マウスリンパ腫由来 EL4 細胞を用いて検討した結果、配合変化生成物は、コントロールと比較して細胞生存率を低下させることが判明した。また、配合変化生成物が活性酸素を発生させることを見出した。これらの結果は、配合変化は効果の減弱のみならず、生体内の活性酸素の発現や有害反応に寄与する可能性を意味する。

以上、注射用 MEPM とアミノ酸輸液製剤の配合変化について、有機化学反応の視点からその原因を検討した結果、アミノ酸輸液製剤に含まれる L-Cys の SH 基が MEPM のβ-ラクタム環へ求核反応することが、配合変化の原因と特定できた。また、反応速度論を利用して、注射用 MEPM とアミノ酸輸液製剤の配合変化の予測式を導くことに成功した。さらに、その成果を他の類似骨格や官能基を有する医薬品に応用し、化学構造の違いによる配合変化の差異を明らかにした。また、初期検討段階ではあるが、β-ラクタム系抗生物質と L-Cys の配合変化物は、培養細胞の細胞生存率を減少させ、配合変化物が有害反応に寄与するおそれを見出した。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 板垣 文雄、工藤 千恵、片桐 幸子、忍足 鉄太、高橋 秀依、夏苺 英昭、渡邊 真知子、L-システインが引き起こす注射用メロペネムとアミノ酸輸液製剤の配合変化、医療薬学、査読有、39 巻、2013、521-527

[学会発表] (計 4 件)

① 中川 幸子、板垣 文雄、飯島 亮介、忍足 鉄太、高橋 秀依、夏苺 英昭、油井 聡、鈴木 るね、関谷 朱美、西 優、山元 孝俊、渡邊 真知子、カルバペネム系抗生物質と L-システインの配合変化物における細胞生存率への影響、第 22 回クリニカルファーマシーシンポジウム、2014 年 6 月 28 日-29 日、東京。

② 片桐 幸子、飯島 亮介、板垣 文雄、忍足 鉄太、高橋 秀依、夏苺 英昭、油井 聡、渡邊 真知子、メロペネム水和物と L-システインの配合変化物に有害作用はあるか?、第 57 回日本薬学会関東支部大会、2013 年 10 月 26 日、東京。

③ 片桐 幸子、板垣 文雄、忍足 鉄太、高橋 秀依、夏苺 英昭、渡邊 真知子、

メロペネムと SH 基を有する医薬品の配合変化、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27 日-30 日、横浜。

④片桐 幸子、工藤 千恵、板垣 文雄、忍足 鉄太、高橋 秀依、夏苺 英昭、庭田 英明、渡邊 真知子、L-システイン による  $\beta$ -ラクタム系抗生物質の分解、第 22 回日本医療薬学会年会、2012 年 10 月 27 日-28 日、新潟。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

板垣 文雄 (ITAGAKI, Fumio)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：70563906

### (2) 研究分担者

忍足 鉄太 (OSHITARI, Tetsuta)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：00279043