

| | |
|---------|-----------------------|
| 氏名(本籍) | さ とう ひで あき 佐 藤 秀 昭 |
| 学位の種類 | 薬 学 博 士 |
| 学位記番号 | 薬 第 284 号 |
| 学位授与年月日 | 昭和63年 6月29日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当 |

学位論文題目 薬物の極微弱化学発光に関する研究

論文審査委員 (主 査)
教授 長 哲 郎 教授 鈴木 康 男
教授 山 中 宏
教授 水 柿 道 直

論文内容要旨

本研究は、最近開発された極微弱化学発光検出装置を使用し、薬剤の安定性を迅速かつ簡便に予測し得る新たな方法を確立することを目的として行った。

薬物の安定性は熱、光、空気（特に酸素）、湿気及び放射線の様な環境因子に影響される。更に、粒子径、用いた溶媒の性質、例えばpHなど、また容器の特性、他の薬物との配合、重金属や微生物の混入などによって影響される。これらの因子による変質を防止または抑制するために、製剤設計上種々の物理化学的対策が施されている。その上で、実際に取り扱われる状態を想定して、あらゆる可能な広範囲の状況における影響を検討すべく様々な条件の下で安定性に対する検討がなされている。しかし、これらは多くの時間と労力を要することから、短時間でその安定性を予測するために種々の努力がなされている。

有機化合物は自動酸化系で、極微弱な化学発光能を有することが知られている。近年、光エレクトロニクス技術の進歩にともない、高感度光電子増倍管が開発され、更に光電子計数法の実用化に成功している。稲葉らはこれらの結果を基に、高感度でしかも測定法がきわめて簡単な極微弱化学発光検出装置を開発した。その結果、従来検出不可能であった極微弱化学発光（extra-weak chemiluminescence, 以下CLと略す）を検出できるようになった。この測定法は現在、食品化学、医学、薬学などの分野において以下に列挙するように、広く応用が試みられている。

薄木らは、食用油脂あるいは食品の酸化により生じるCLを計測し劣化度の判定に応用し、比較的良好な結果を得たと報告している。更に、生体内脂質の過酸化に伴ってCLが生じることも明らかになり、その過酸化度の判定に応用され、今後さらに発展が期待できる。特に、依田らは糖尿病患者の血液が正常人の血液と比較して有意にCLが高いことを見いだしており、その原因として代謝障害時に発生する活性酸素、フリーラジカルおよび過酸化脂質を上げている。医薬品分野では、水野らが行った実験がある。彼らは、水溶液中で比較的安定な化合物（ニコチン酸、コハク酸、グリシン、ニコチナミド及び酒石酸）と比較的不安定な化合物（L-アスコルビン酸、5-リン酸ピリドキサール、リボフラビン、グルクロノラクトン及びリン酸アデノシン）のCLを測定し、前者の群からはCLが認められなかったが、後者からはCLが認められたことを報告している。このことから、彼らはCLの有無が薬物の安定性とよく対応していると結論している。以上述べたような知見から、医薬品製剤の安定性が、CLを測定することにより迅速かつ簡便に推測できるであろうと考え、以下の実験を行った。

第一章では、構造が単純でよく知られている有機化合物（116種類）のCLを測定した。有機化合物のCL値は、20℃で0～13060 counts/10s(平均32 counts/10s)、50℃で0～22943 counts/10s(平均93 counts/10s)、80℃で2～263289 counts/10s(平均569 counts/10s)と広範囲に分散

し、温度上昇にともない増加した。特に、アルキン類のフェニルアセチレン (80°C, 23717 counts/10s), 脂肪族アミン類のトリエチレンテトラミン (80°C, 35502 counts/10s), 脂肪族アルデヒド類のドデカナール (80°C, 41863 counts/10s), エポキシド類のステレンオキシド (80°C, 263289 counts/10s), 過酸化物類のm-クロロ過安息香酸 (80°C, 40979 counts/10s) などの化合物に高いCLが認められた。一方、アルコール類, アミン塩やカルボン酸誘導体などは低いCL値を示した。

第二章では、現在臨床に適用されている医薬品のうち錠剤, カプセル剤 (139種類) のCLを測定した。錠剤, カプセル剤のCL値は、広範囲に分散しており20°Cで0~1380 counts/10s, 50°Cで0~10800 counts/10s, 80°Cで37~245000 counts/10sであり、温度の上昇にともない増加した。特に、三環系抗うつ剤のトフラニール錠 (塩酸イミプラミン), アンプリット錠 (塩酸ロフェプラミン), デフェクトン錠 (カルピプラミン), 抗血液凝固剤のワーファリン錠 (ワーファリンカリウム), 抗ヒスタミン剤のプロエントラ錠 (塩酸トリプロリジン) などに高いCL値が認められた。これらの薬剤はいずれも取扱上の注意事項において『遮光保存』が推奨されており、薬剤の安定性とCLに相関関係の有ることが推測された。そこで、各々の医薬品の添付文書を参考にして、試験した全ての錠剤, カプセル剤を次の3群に分類した。即ち、『室温保存薬品』を安定性の高い薬品の群と考えてA群, 『開封後はなるべく速やかに使用する薬品』を比較的安定であるが、A群ほど安定でない薬品の群と考えてB群, 『遮光, 気密容器保存薬品』を不安定な薬品の群と考えてC群とした。各群間のCL値に有意差があるかないかを統計学的に処理した結果、50及び80°CでA群とC群の間に99%の信頼度で有意差が認められた。従って、医薬品製剤のCLを測定することにより、その保存条件を設定できる可能性が示唆された。

第三章では、現在臨床で使用されている漢方エキス製剤 (116種類) のCLを測定した。漢方エキス製剤のCL値は、20°Cで0~101 counts/10s (平均8 counts/10s), 50°Cで0~430 counts/10s (平均50 counts/10s), 80°Cで50~12117 counts/10s (平均890 counts/10s) と広範囲に分散していた。高いCL値を示した漢方エキス製剤は、防己黄耆湯, 当帰芍薬散, 桂枝加竜骨牡蛎湯, 猪苓湯, 補中益気湯, 加味帰脾湯, 帰脾湯, 滋陰至宝湯であった。漢方エキス製剤のCLは、酸素通気下で増加し、窒素通気下で減少した。また、酸化の度合の指針である2,6-ジクロロフェノールインドフェノール値との間に、相関係数 $r = -0.4378$ ($y = -0.059x + 3.5073$), $p < 0.05$ で負の相関が認められた。これらの結果、漢方エキス製剤のCLは空気中の酸素が強く関与しており、酸化反応に伴うCLであることが示唆された。

第四章では、高いCL値を示したトフラニール錠のCLが主成分の塩酸イミプラミン由来であることを明確にし、更に、三環系抗うつ剤のCL本体を推定した。トフラニール錠と塩酸イミプラミンのCLは共に高い値を示し、類似した発光スペクトルを示したことから、トフラニール錠のCL

は塩酸イミプラミン由来であることが確認された。三環系抗うつ剤、塩酸イミプラミン、塩酸クロミプラミン、マレイン酸トリミプラミン、塩酸デシプラミン、塩酸クロカプラミン、塩酸カルピプラミンは共に高いCL値を示し、420から610nm間の波長域に共通して5つの発光帯(430, 450~460, 480~500, 520, 570nm)が認められたことから、三環系抗うつ剤のCLは、その基本構造である10, 11-dihydro-5H-dibenz(b,f)azepine構造由来であることが示唆された。10-11位が飽和している化合物に相当するイミノジベンジルおよびN-メチルイミノジベンジルのCL値は不飽和の化合物に相当するイミノスチルベンに比べて70倍高い値を示した。従って、三環系抗うつ剤のCLはazepine環の10-11位に発生する主因があることが示唆された。このことは、10, 11位にあるような活性メチレン水素は一般的に脱離し易いという事実からも裏付けられる。

第五章では、塩酸イミプラミンから発生するCLのメカニズムを推定した。塩酸イミプラミンのCLは、セル内に窒素ガスを導入すると著しく減少し、酸素ガスを導入すると著しく増加した。また、経時的にCLの増加にともない過酸化水素の増加が認められた。更に、抗酸化剤の添加によって著しくCLが抑制された。これらの結果、塩酸イミプラミンから生ずるCLは、10-11位の自動酸化反応系から生じるものであると結論できた。このことは、空气中で測定した電子スピン共鳴スペクトル(ESR)のシグナル強度がCLと同様に温度に強く依存していたのに対し、真空下で

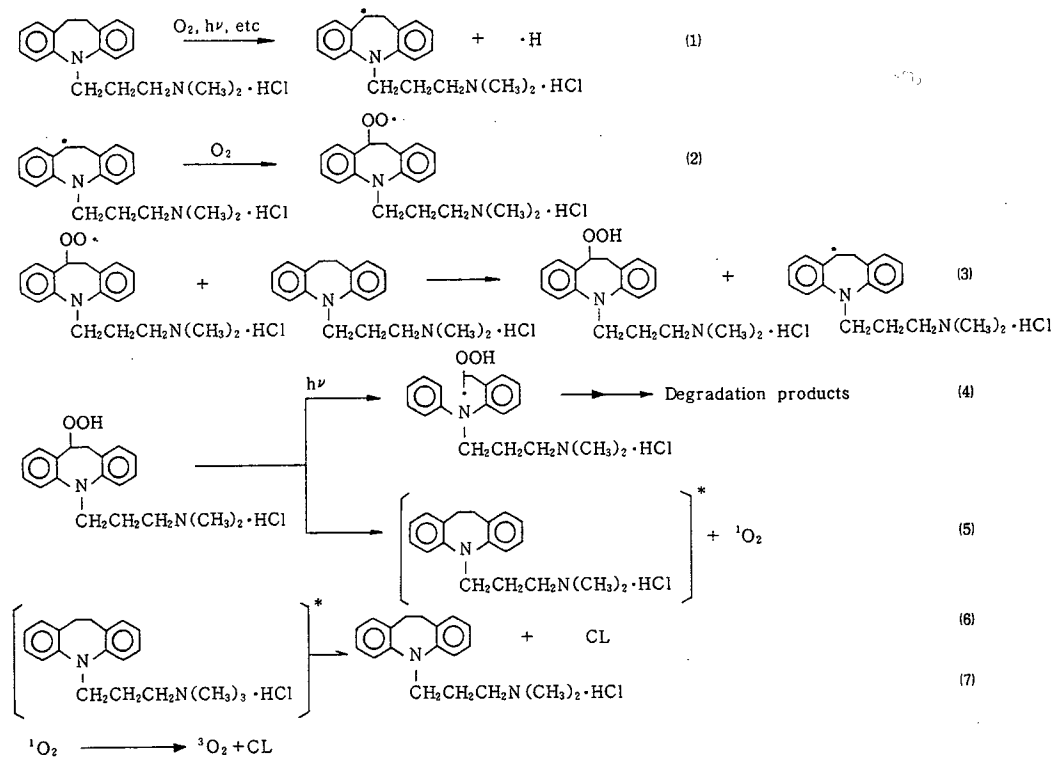


Chart 1

測定したESRのシグナル強度及び窒素通気下でのCLは、共に温度による影響が認められなかったことなどからも裏付けられる。この自動酸化反応過程において、イミプラミンラジカル及びイミプラミン過酸化ラジカルが存在することが予想される。そこで、 -150°C で塩酸イミプラミンに紫外線を照射し、ESRによってラジカルをトラップすることを試みた結果、 g 値2.0046のイミプラミンラジカルと g 値2.0059の過酸化ラジカルの存在が確認された。これらの結果から、塩酸イミプラミンの自動酸化によって発生するCLは、前ページのchartに示す経路により生成するものと考えた。

結 論

最近開発された極微弱化学発光検出装置を使用して、CLを測定することにより医薬品製剤の安定性を迅速かつ簡便に予測し得ることが明らかになり、医薬品製剤の保存条件を決定できる可能性が示唆された。また、医薬品製剤の安定化剤や賦形剤の選択、同一製剤のロット間の品質の比較、新しい抗酸化剤の開発などに関しても本法により迅速かつ簡便に検討できると考えられる。

審査結果の要旨

医薬品は製造工程および貯蔵中に変質を防止または抑制するために、製剤設計上種々の物理化学的対策が施されている。しかし保管中に熱、光、空気、放射線のような環境因子の影響を受けるので、実際に取り扱われる状態を想定して、あらゆる可能な広範囲の状況における影響を検討すべく研究がなされているが、多くの時間と労力を要することから、これらを解決する方法も重要な研究課題である。

近年、光エレクトロニクス技術の進歩に伴い高感度電子増倍管が開発され、さらに光電子計数法の実用化が成功し、高感度でしかも測定法がきわめて簡単な極微弱化学発光 (extra-weak chemiluminescence, CL) 検出装置が市販されはじめた。本論文はこの装置を用いて、薬剤の安定性を高感度、迅速かつ簡便に予測しうる新たな方法の確立を目的として研究された。

まず、汎用有機化合物116種のCLを20, 50, 80°Cで測定した。10秒間のCLカウント数は構造により0~26万と著しく異なり、また温度上昇に伴ない増加した。概して被酸化性の官能基を有する化合物に高いCLが測定された。

ついで、臨床医薬品のうち錠剤、カプセル剤139種のCLを測定し、塩酸イミプラミン、塩酸ロフェプラミン、カルプラミン、ワーファリンカリウム、塩酸トリプロリジンを主な薬効成分とするものに高いCL値が認められた。これらの医薬品をA群 (室温保存薬品)、B群 (開封後はなるべく速やかに使用する薬品)、C群 (遮光、気密容器保存薬品) に分類し、統計処理の結果50, 80°CでA群とC群の間に99%信頼度で有意差が認められた。したがって、医薬品のCL測定が保存条件の設定に利用できる可能性が示唆された。

漢方エキス製剤116種のうち、桂枝加竜骨牡蛎湯など8製剤に高いCL値が認められ、酸素通気下で増加、窒素通気下で減少し、酸化反応に伴うCLであることが矛盾なく説明された。

また、高いCL値を示した三環系抗うつ剤の発光スペクトルが、塩酸イミプラミンの基本骨格である10, 11-dihydro-5H-dibenz[b,f]azepineのそれに相当することを実証し、さらに電子スピン共鳴スペクトル (ESR) による検討を加えた。酸化反応により生成するラジカルはazepine環の10または11位の活性メチレン水素が脱離したイミプラミンラジカルおよびその酸素付加体を経て開環した過酸化ラジカルであることを確認した。これらの結果と併せて塩酸イミプラミンの自動酸化機構を提案した。

このように、本論文は極微弱発光検出装置を使用したCLの測定により、医薬品製剤の安定性の高感度、迅速かつ簡便な評価および保存条件の選定ができることを明らかにすると同時に、製剤学上への広い利用の可能性を示唆したものであり、薬学領域の学位論文として十分価値あるものと認める。