

東京工科大学

博士学位論文

エダラボン水溶液の安定化剤とその作用機序

平成 29 年 9 月

田中正彦

目次

第1章 緒言	2
第2章 エダラボン水溶液の安定化剤とその作用機序－亜硫酸水素ナトリウム	6
第3章 エダラボン水溶液の安定化剤とその作用機序－グルタチオン	22
第4章 結語	48
引用文献	50
業績	54
論文一覧	63
謝辞	64

第1章 緒言

フリーラジカルが脳虚血後の主な傷害因子のひとつであることは数多く報告されている。エダラボン(3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, 図 1-1)は脳血管や神経細胞の傷害因子である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¹⁾²⁾。その後, 難治性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)の適応が 2015 年に日本で³⁾, 2017 年に米国で⁴⁾⁵⁾承認された。

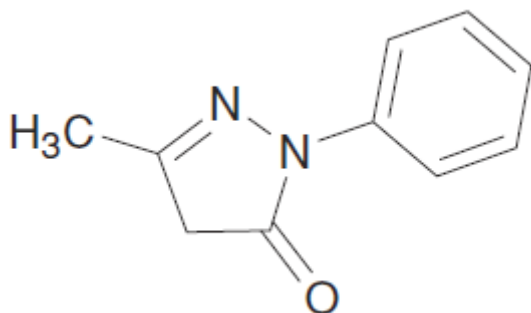


図 1-1 エダラボンの構造式

エダラボンのラジカル消去機構は, エダラボンアニオンがペルオキシラジカルを一電子還元することであることが解明されており⁶⁾, 中大脳動脈閉塞ラットの細胞傷害による酸化ストレスをエダラボンが減弱することを示している⁷⁾。さらにペルオキシナイトライト消去作用に言及がなされており⁸⁾, ALS での有効性の本態はペルオキシナイトライト消去作用であることが示唆されている⁹⁾。

エダラボンの最初の適応症である脳梗塞急性期では, 意識障害や嚥下障害を有する患者を対象とすること及び脳梗塞の急性期の短期間に限局した臨床使用であることが考慮され, 的確な投与が可能な注射薬として開発された。エダラボンは点滴静注で

投与され、脳梗塞急性期及びALS両方の適応を有する先発品の注射剤には、1管20 mLにエダラボン30 mgが含有されるアンプル¹⁰⁾と、1袋100 mLにエダラボン30 mgが含有されるバッグ¹¹⁾が存在し、添加物の亜硫酸水素ナトリウムとL-システイン塩酸塩水和物の添加量は20 mg及び10 mgと同一である。

先行技術文献(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として亜硫酸塩を添加し検討がなされ、安定性が増すことが見出されたが効果は不十分であった。更に他の添加剤について検討がなされ、システイン類が単独では安定化効果を認めないが、亜硫酸塩とシステイン類を組み合わせることで安定性が向上したため、亜硫酸水素ナトリウムとL-システイン塩酸塩が添加された。実施例では、溶液をアンプルに充填し、容器内の空気を窒素で置換した後熔封して注射剤を得ている。また明細書には、調製に用いる水を予め脱気し、かつ分注後容器内の空気を窒素ガスなどの不活性ガスで置換することにより安定性は更に向上すると記載されている¹²⁾。

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¹³⁾¹⁴⁾。

また、近年、後発医薬品の上市に伴い、安定性向上を目的に用いられた添加物の違いが、薬効の根幹であるラジカル消去能に影響を及ぼしているとの報告がなされている¹⁵⁾¹⁶⁾。

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亜硫酸塩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の原因になるかもしれないと指摘している⁴⁾⁵⁾。

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る。

エダラボンは固体ではとても安定だが、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極めて不安定である。pH7でのエダラボンのpKaは7.0なので、エノール型とエダラボンアニオンの濃度は同じである。エダラボンアニオンは分子上酸素を含むフリーラジカルに電子を与えることができるため、抗酸化作用を有する活性の高い分子である(図1-2)。その結果生じる3つの共鳴構造を有するエダラボンラジカルは比較的安定である(図1-2)。

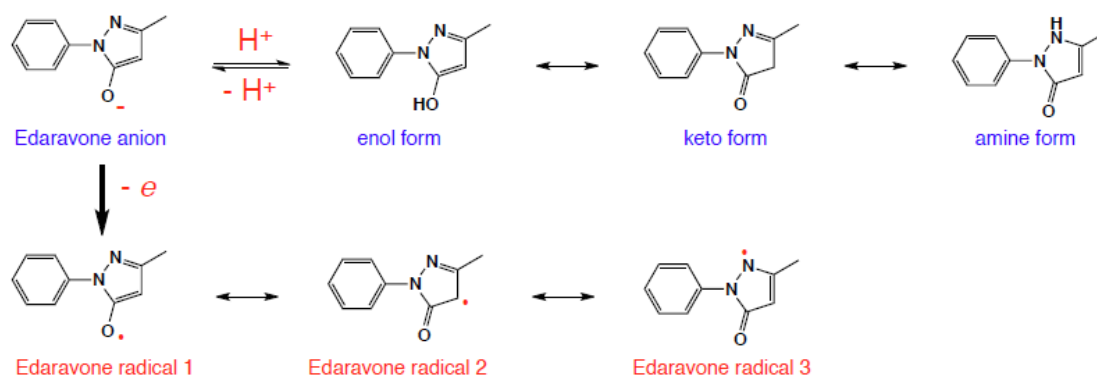


図 1-2 エダラボンの互変異性体, エダラボンアニオン及びエダラボンラジカルの構造

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、前者はエダラボンアニオン濃度を下げ、後者はエダラボンアニオンから酸素への電子供与を防ぐ。さらに、エダラボン注射剤の特許文献によると、水溶液中での酸化反応防止手段として種々の抗酸化剤のうち亜硫酸塩の添加で安定性が増すことが見出されたが効果は不十分であり、単独では安定化効果を認めないシステイン類を組み合わせ

て添加することにより安定性の優れた注射剤が得られることが見出され¹²⁾、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。本研究では、エダラボン水溶液の安定性に対する亜硫酸水素ナトリウムの効果を検討した。その際、亜硫酸水素ナトリウム自体の効果を得るため、低 pH と脱酸素をサンプルに施さなかった。そして、亜硫酸水素ナトリウムがエダラボン水溶液の安定化に有効であることを観察したが、エダラボンの分解物の抑制は不完全であった。エダラボンの亜硫酸付加体の形成が¹³C NMR と HPLC による検討から示唆された。それは平衡を安定化に良い方向に動かし、エダラボンアニオンを減少させることができる。

さらに、システインが現在安定化剤として用いられているが、その効果を改めて検討すると共に、チオール基 (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ながら安定化効果を検討し、より優れた効果を有することを見出した。

加えて、米国 FDA が指摘する、アナフィラキシー症状や感受性の高い人に致命的なアレルギー反応を引き起こす可能性のある亜硫酸水素ナトリウム使用回避の可能性を見出した。

第2章 エダラボン水溶液の安定化剤とその作用機序ー亜硫酸水素ナトリウム¹⁷⁾

2-1 エダラボン安定化の標的

エダラボンは水中でケト型、エノール型、アミン型の互変異性を取り、平衡状態に存在する。そして、エノール型からプロトンが離れてエダラボンアニオンとなる。エダラボンアニオンが電子を与えてエダラボンラジカルになるとO, C, Nにラジカルが位置する共鳴混成体を取り、安定なラジカルが故に電子を与え易い性質を持つ。(図2-1)

従って、エダラボンアニオンをケト型、アミン型の平衡状態に寄せることが安定化の標的となる。

本章では亜硫酸水素ナトリウムに焦点して行った検討結果を詳述する。

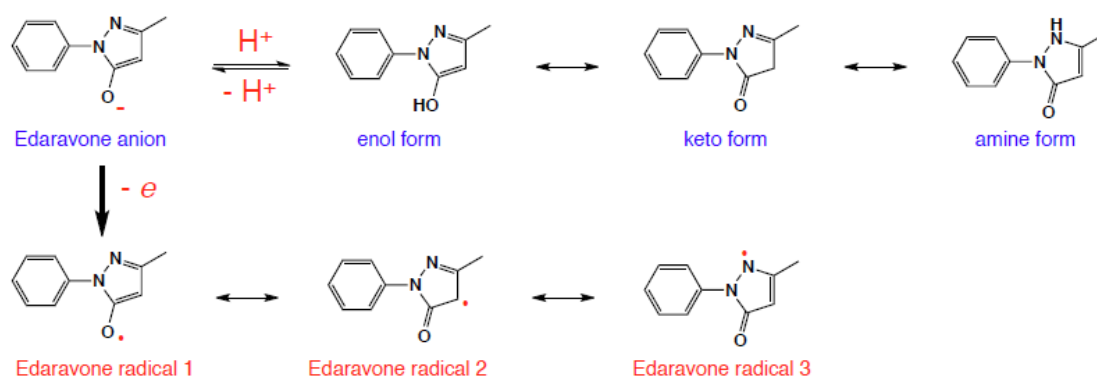


図 2-1 エダラボンの互変異性体, エダラボンアニオン及びエダラボンラジカルの構造

2-2 実験方法

試薬

エダラボン, 亜硫酸水素ナトリウムは市販の特級品を用いた。

エダラボン: MW 174.20, Lot CTK0084, Wako, Japan

亜硫酸水素ナトリウム: MW 104.06, Lot PAR2104, Wako, Japan

2-2-1 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

エダラボン 30 mg, 亜硫酸水素ナトリウム 20 mg を各々水で溶解した。エダラボンの溶解に際しては, 飽和溶解度 2 mg/mL の溶液を得るべく, 1 N 水酸化ナトリウム溶液を滴下して溶解した後, 1 N 塩酸で pH を 5~6 に調整した。エダラボン単独またはエダラボンと亜硫酸水素ナトリウムを混和し, 各々全量 20 mL に調製し, スクリュー管に充填し, 密栓しサンプルとした。サンプル容器内は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。エダラボン濃度は液体クロマトグラフ (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) 法により, サンプル調製時 (0 週) のエダラボンのピーク面積値に対する 2, 4 週間後のピーク面積の比から濃度を測定した。

HPLC の機器と測定条件は次の如くである。

UV detection: λ 295 nm, 875-UV, Japan spectroscopic, Japan

Column: CAPCELL PAK ADME, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm, Shiseido, Japan

Mobile phase: 40 mM NaH₂PO₄/methanol = 40/60, v/v

Flow rate: 0.5 mL/min, LC-20AD, Shimadzu, Japan

2-2-2 不溶性異物の分析

2-2-2-1 TOFMS による分析

2-2-1 で調製したサンプルを 60 °C, 4 週間保存した時点の不溶性異物を, 遠心分離及びデカンテーションで抽出し, メタノールで溶解し, 逆相 HPLC と組み合わせた TOFMS (Time Of Flight Mass Spectrometry) で分析した。測定条件は次の如くである。

TOFMS: JMS-T100LC, JEOL Ltd., Tokyo, Japan

Mobile phase: 60% methanol containing formic acid (2.6 mM)

Deliver rate: 1.0 mL/min

Column for separation: ODS, 5 µm, 4.6 mm × 250 mm, Wako, Osaka, Japan

UV detector tandemly connected to TOFMS: absorption at 210 nm

1/4 of the eluent was induced into TOFMS

Negative ionization potential: -2000 V

Ring lens voltage: -5 V

Outer orifice voltage: -10 V

Inner orifice voltage: -5 V

Ion guide voltage: -500 V

Internal standard for m/z calibration: trifluoroacetic acid (TFA)

2-2-2-2 過酸化水素の検出

過酸化水素はイソルミノール検出による特異的 HPLC 法を用いて測定した¹⁸⁾。

HPLC の条件は次の如くである。

Column: SUPELCOSIL LC-NH₂, 5µm, 4.6 mm I.D. × 250 mm, Supelco, USA

Mobile phase: methanol/40 mM NaHPO₄ = 90/10, v/v

Flow rate: 1.0 mL/min

2-2-3 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

NMR 用サンプルを DMSO-d6 と D₂O を用いて、2-2-2 で調製したサンプルと同じモル濃度になるように、次の如く調製した。

エダラボン 2.25 mg を DMSO-d6 0.15 mL に溶解し、D₂O 1.35 mL を加えサンプルとした。

エダラボン 2.25 mg を DMSO-d6 0.15 mL に溶解し、亜硫酸水素ナトリウム 1.5 mg を D₂O 1.35 mL に溶解し、混和しサンプルとした。

(エダラボン (M.W. 174. 20) : 8.61 mM, NaHSO₃ (M.W. 104.06) : 9.61 mM)

NMR (¹H NMR, ¹³C NMR) の条件は次の如くである。

Reorder: Bruker Avance 600 spectrometer, Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany

Probe: BBO 600MHz S3 5 mm, Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany

Temperature: 25 °C

Relaxation time: 1sec (¹H NMR), 2sec (¹³C NMR)

加えて、Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC) も測定した。

また、NMR に供した DMSO-d6/D₂O = 10/90 に対応する DMSO/H₂O = 10/90 を溶媒に用いた場合の安定性を確認すべく、2-2-1 に準じて、エダラボン 30 mg を DMSO で、亜硫酸水素ナトリウム 20 mg を水で溶解し、エダラボン単独またはエダラボンと亜硫酸水素ナトリウムを混和し、各々全量 20 mL に調製し、スクリー管に充填し、密栓しサンプルとした。サンプルの保存及びエダラボン濃度、着色、不溶性異物の観察は 2-2-1 と同様に行った。

2-2-4 HPLC 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

溶媒に水を用い、エダラボン 1 mM, 亜硫酸水素ナトリウム 1 mM の溶液を調製し、エダラボン単独の場合と、エダラボンと亜硫酸水素ナトリウムを混和した場合の、アミノカラムを用いた HPLC によるエダラボンと亜硫酸水素ナトリウムの相互作用を検討した。HPLC の条件は次の如くである。

UV detection: λ 240 nm, SPD-20A, Shimadzu, Japan

Column: SUPELCOSIL LC-NH 2, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm, Supelco, USA

Mobile phase: 40 mM NaH₂PO₄/methanol/CH₃CN = 5/45/50, v/v

Flow rate: 1.0 mL/min, LC-20AD, Shimadzu, Japan

2-3 実験結果及び考察

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

亜硫酸水素ナトリウムの添加効果は、溶媒が水の場合、エダラボン濃度で 4% 上回った(図 2-2A)。着色・不溶性異物は、エダラボン単独では黄土色の濁った液色で粒状または雲状の黄色の不溶性異物が存在し、亜硫酸水素ナトリウム添加では微黄色澄明な液色で粒状の黄色の不溶性異物が存在し、亜硫酸水素ナトリウム添加の着色・不溶性異物は少なかったが出現を抑えることは出来なかった(図 2-3A)。

また、NMR 測定に供したサンプルに準じた、溶媒を DMSO/H₂O = 10/90 とした場合、エダラボン濃度で 8% 上回った(図 2-2B)。着色・不溶性異物は、エダラボン単独では黄色で濁りのある液色で粉状または雲状の浮遊型と沈殿型の不溶性異物が存在し、亜硫酸水素ナトリウム添加では微黄色澄明な液色で粒状の浮遊型と沈殿型の不溶性異物が存在し、亜硫酸水素ナトリウム添加の着色・不溶性異物は少なかったが出現を抑えることは出来ず(図 2-3B)、溶媒が水の場合と本質的に変わらなかった。

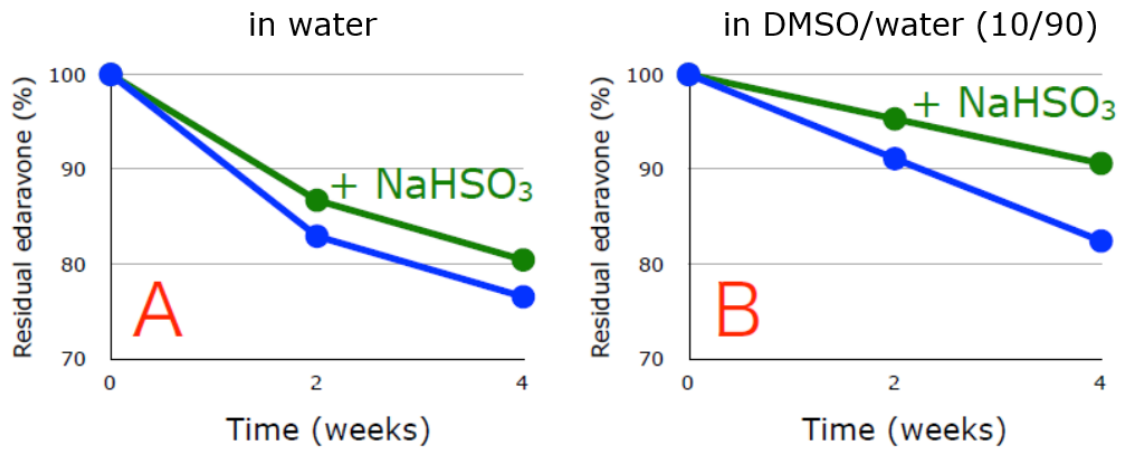


図 2-2 亜硫酸水素ナトリウム添加によるエダラボン濃度低下の抑制効果

A: 溶媒; 水, B: 溶媒; DMSO/水 = 10/90

UV detection: λ 295 nm

Column: CAPCELL PAK ADME, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm

Mobile phase: 40 mM NaH₂PO₄/methanol = 40/60, v/v

Flow rate: 0.5 mL/min

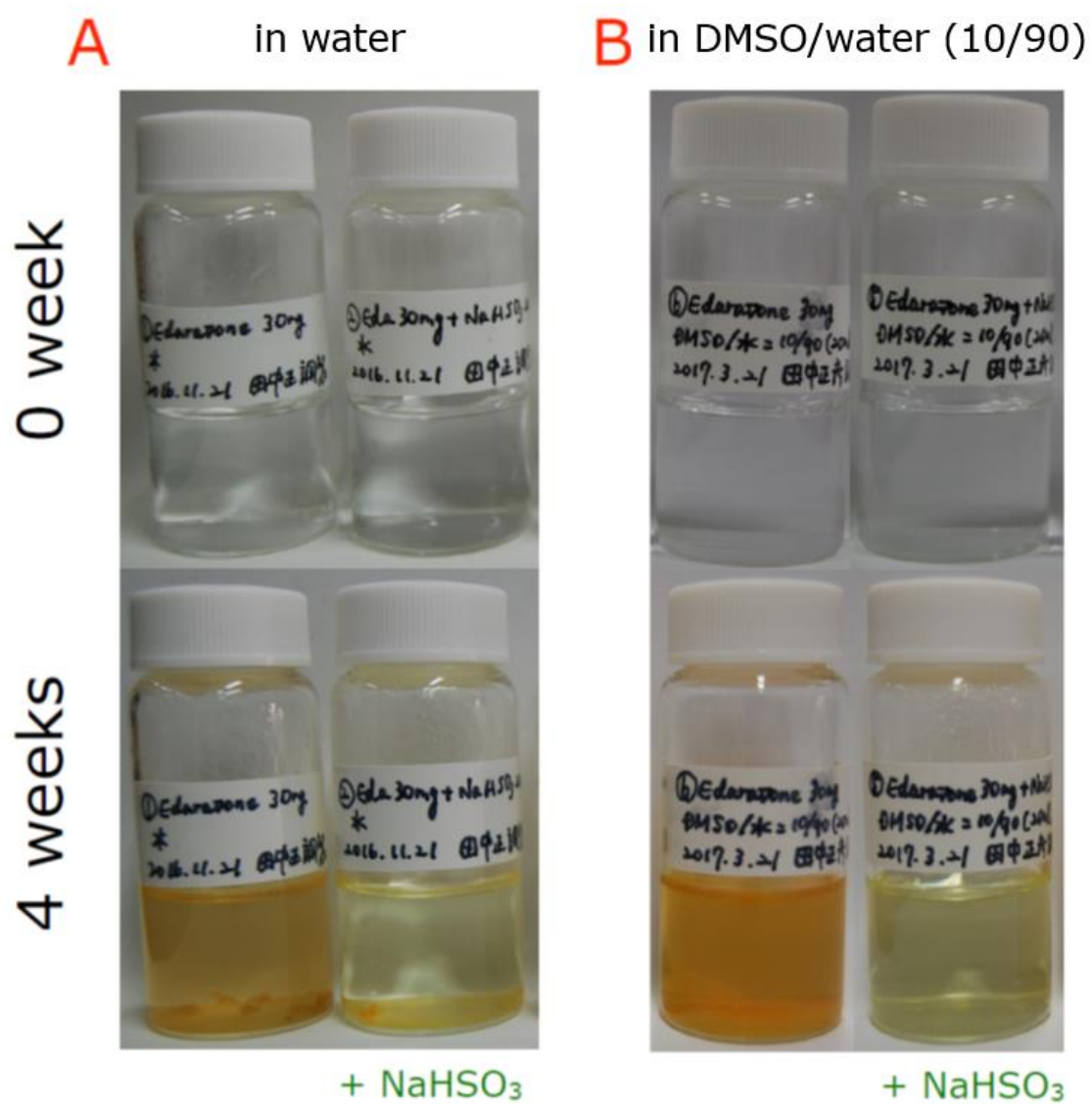


図 2-3 不溶性異物生成に対する亜硫酸水素ナトリウム添加効果

A: 溶媒; 水, B: 溶媒; DMSO/水 = 10/90

2-3-2 不溶性異物の分析

2-3-2-1 TOFMS による分析

不溶性異物を抽出しメタノールで溶解し、 λ 210 nm の逆相 HPLC クロマトグラムで分析した結果、2 つの化合物の存在を示した(図 2-4A)。保持時間の短い compound A の、TFA を内部標準に用いた m/z 値は-173.10 であり、この値はエダラボン(-173.10)と一致した(図 2-4B)。さらに、エダラボン標準品の保持時間は compound A と一致したことからエダラボンと同定した。

保持時間の長い compound B の m/z は-517.30 であり、エダラボントリマー(4,4-bis-(3-methyl-5-oxo-1-phenyl-2-pyrazolin-4-yl)-3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, monoisotopic mass-1 = -517.20)と同定した(図 2-4B)。-344.19 のフラグメントはエダラボンダイマー(4,4'-bis(3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one)アニオンラジカルであり(monoisotopic mass-1 = -344.13)、消失したフラグメント(-517.30 + 344.19 = -173.11)は、非アニオンエダラボンラジカルと推定された。上記フラグメントがネガティブモードでは検出されないことは妥当である。これらの結果は compound B がエダラボントリマーであることを支持する。

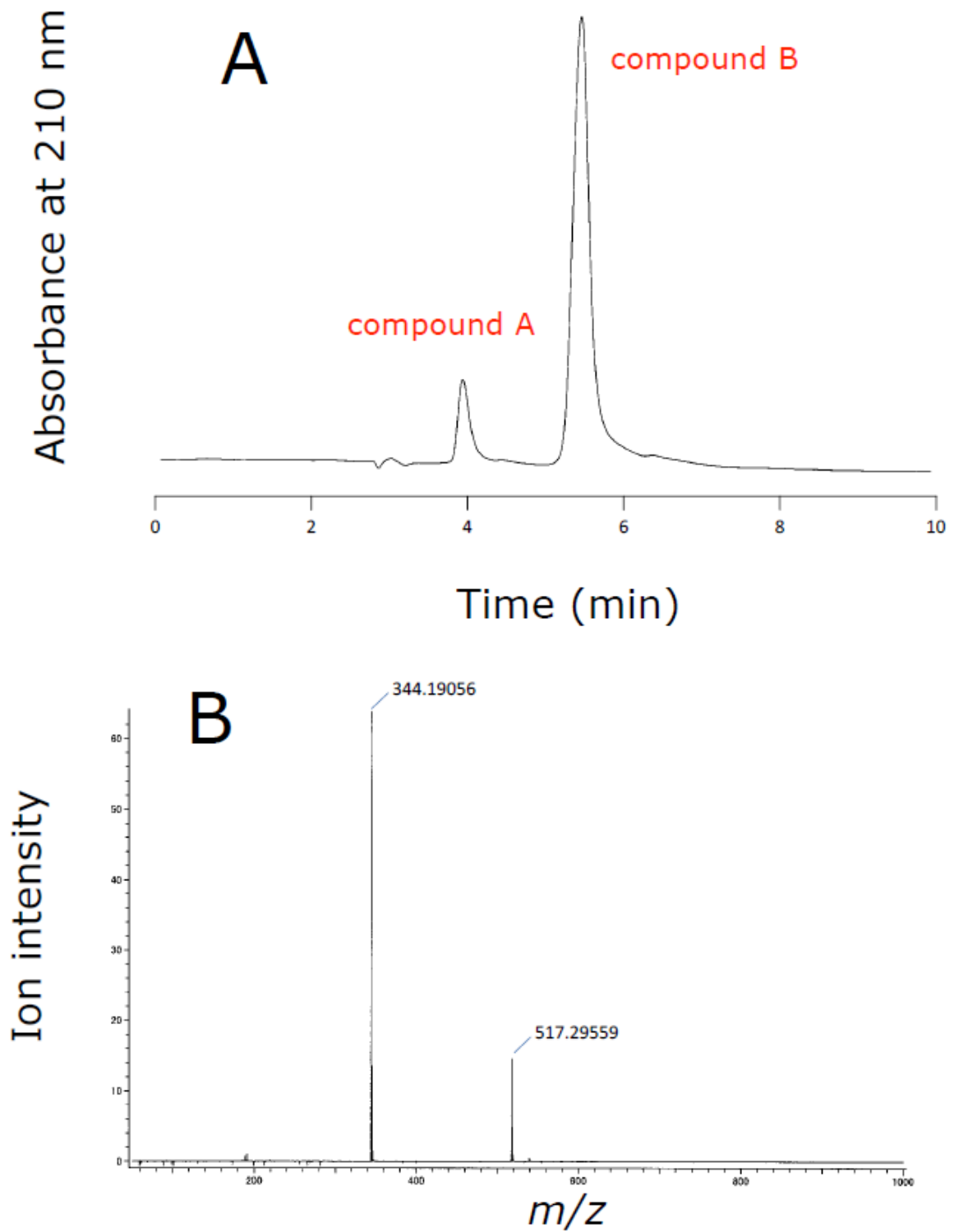


図 2-4 不溶性異物の UV クロマトグラム(A)及び compound B の TOFMS 分析(B)

エダラボントリマーは、無酸素下では DPPH¹⁹⁾ または phenoxyl ラジカル²⁰⁾ とエダラボンが反応して生成され、これらの結果はエダラボンラジカル 2 がトリマーの前駆体であることを示す。

2-3-2-2 過酸化水素の検出

本実験条件では、酸素はエダラボンアニオンにより消費され、エダラボンラジカルとスーパーオキシドを生成する。スーパーオキシドは過酸化水素と酸素に不均化する。事実、過酸化水素を特異的に測定する HPLC/化学発光法で、少なくとも 6 μM の過酸化水素の生成を確認した(図 2-5)。エダラボン溶出によるネガティブピークはエダラボンがバックグラウンドの化学発光をクエンチしたためである(図 2-5)。

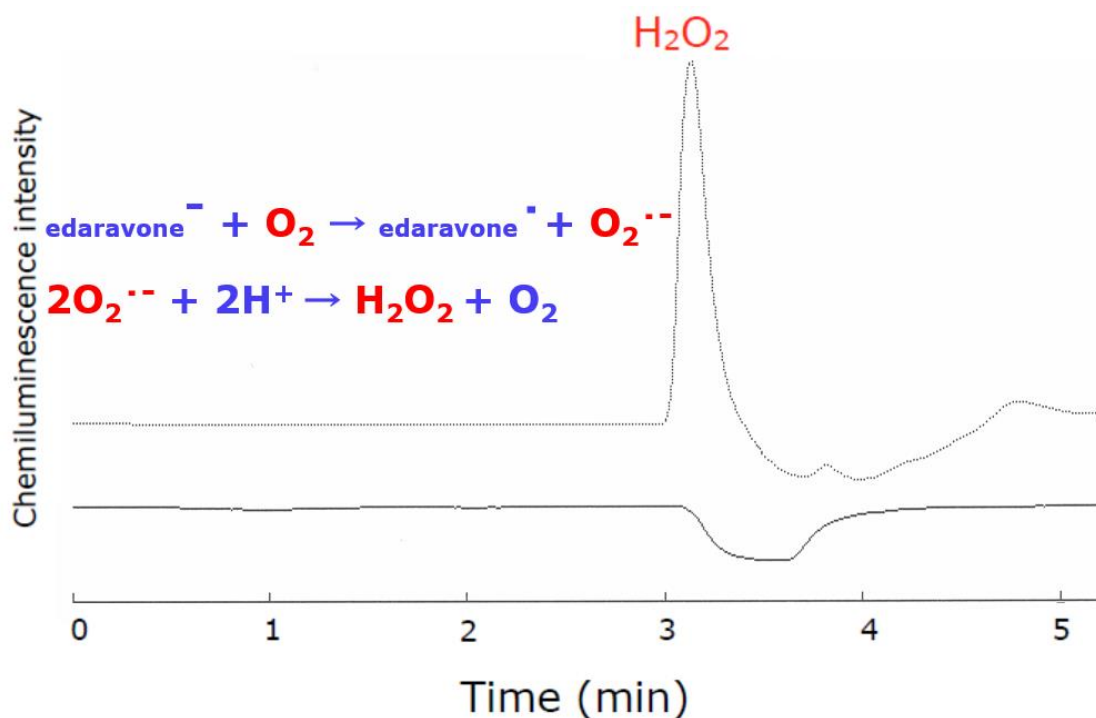


図 2-5 過酸化水素の検出

実線: 8.61 mM エダラボン水溶液調製直後, 点線: 60 °C, 4 週間保存後

2-3-2-3 エダラボントリマーの生成機序

図 2-6 はエダラボンラジカル 2 からのエダラボントリマーの推定生成機序である。無酸素下では、2 分子のエダラボンラジカル 2 が組み合わさりエダラボンダイマー 1 (Bis(3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one))となる。そして、エノール化で、より安定な共役エダラボンダイマー 2 に転換する。ダイマー 2 は容易にダイマーラジカル 1 に転換する。ダイマーラジカル 1 は 4 つの二重結合を持つ共役結合体でとても安定なためである。ダイマーラジカル 1 はダイマーラジカル 2 に転位し、エダラボンラジカル 2 と結合してエダラボントリマーを形成する。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は注目すべき点であり(図 2-4A), このことは、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。

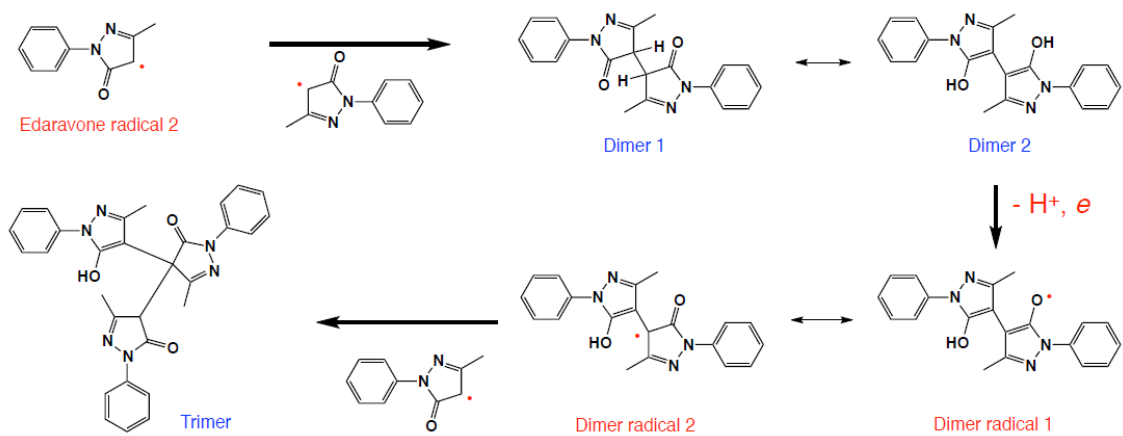


図 2-6 不溶性異物中のエダラボントリマーの生成機序

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

2-3-3-1 エダラボンの ^{13}C NMR スペクトラム

ケト型のエダラボンが非プロトン溶媒中では最も安定と考えられる。実際、 CDCl_3 中のエダラボンの ^{13}C NMR スペクトラムは 8 つのシングルピークを示し、図 2-7A に示すように帰属され、ケト型のエダラボンを支持する。

溶媒を $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O} = 10/90$ に変えると、スペクトラムは図 2-7B に示すように劇的に変化する。C3 と C4 のケミカルシフトは消失し、C1, C6, C7, C8 のケミカルシフトは移動すると共に分割し、C2 のケミカルシフトは移動した。これらの結果は、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。

興味深いことに、C1 のケミカルシフトは C3 の状態に影響される。そこで、C3 がメチレンの場合の C1 を 1(3d) (d: double)と、C3 がメチンの場合の C1 を 1(3s) (s: single)と名付けた。

C1(3s)は C1(3d)よりピークの高さが高いことから、エノール型とエノールアニオン型がケト型より支配的であった。10% DMSO-d_6 の D_2O はプロトン性溶媒であり、エノール型のエダラボンを安定化する。そしてエノール型はプロトンとエダラボンアニオンを遊離することから、この結果は整合する。さらに、HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) による測定で、42 ppm のメチレン(3d)より 92 ppm のメチン(3s)に C3 の存在が優勢だった(図 2-8)。この結果は、上述のエノール型とエノールアニオン型が支配的であることと一貫性がある。

2-3-3-2 亜硫酸水素ナトリウム添加時の ^{13}C NMR スペクトラム

亜硫酸水素ナトリウムはカルボニルと反応して亜硫酸付加体を形成する(図 2-7)

21)22)。エダラボンのケト型とアミン型はカルボニル基を有することから、2種類の亜硫酸付加体が考え得る。C1(3d)より C1(3s)のピークの高さが大きいことからケト型の亜硫酸付加体2よりもアミン型及び亜硫酸付加体1が支配的であることを示している。亜硫酸付加体1では6原子(H-N-N-C-S-O)からなる分子内水素結合が想定され、これによる亜硫酸付加体1の安定化が要因と考えられる。亜硫酸水素ナトリウム添加によりエダラボンのケト型のカルボニルとは異なるC4のカルボニルケミカルシフトが再度出現した。これもアミン型のカルボニルと考えられる。

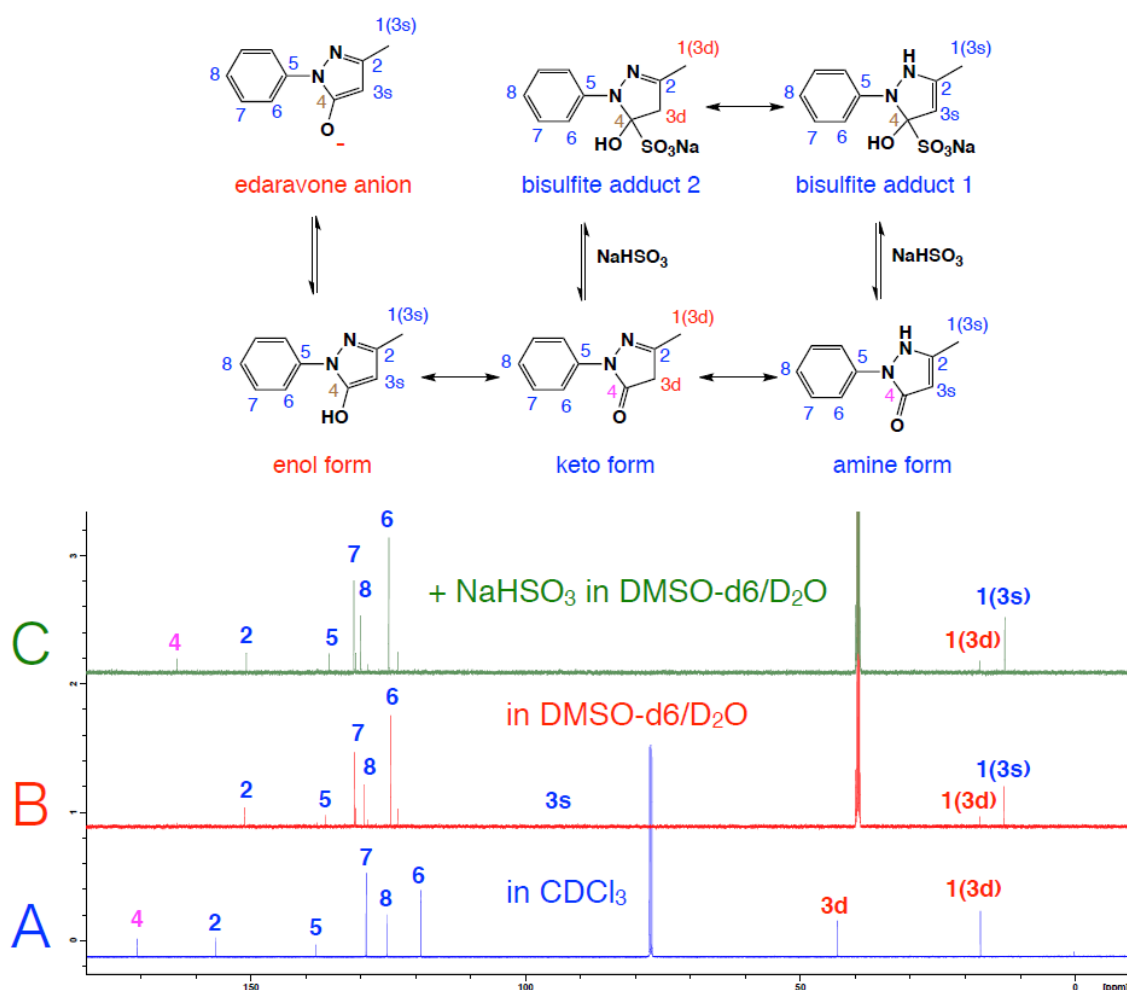


図 2-7 エダラボン単独(A, B)及び亜硫酸水素ナトリウム添加時(C)の¹³C NMR スペクトル

HMBCGP
sample#6
edaravone
DMSO 10%

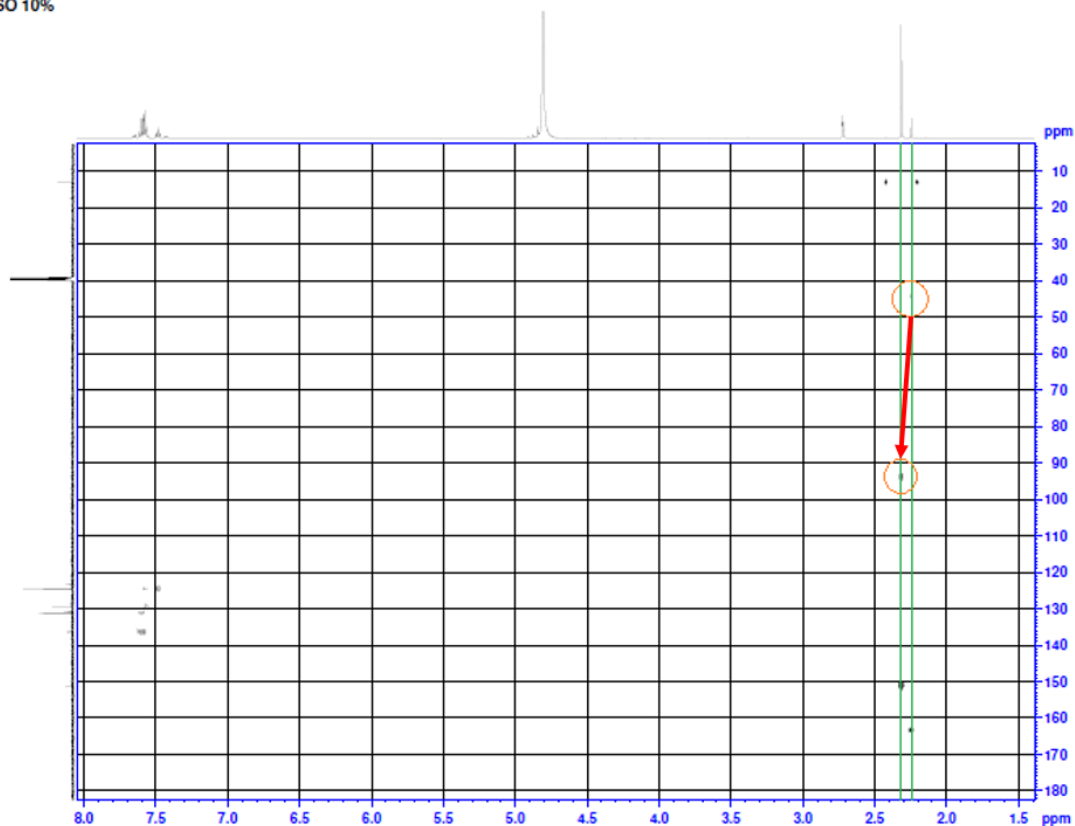


図 2-8 エダラボン単独(B)の Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC) NMR スペクトル

2-3-4 HPLC によるエダラボンアニオンと亜硫酸水素ナトリウムの付加体の検出

図 2-9 の実線はエダラボン水溶液を注入した際のクロマトグラムで 2 つのピークを示している。aminopropylsilyl column (LCNH₂)は表面にカチオンを保持するので、非イオン型のエダラボンより、エダラボンアニオンとの相互作用が強い。そのため、保持時間のより長い 3.9 分のピークがエダラボンアニオンであり、保持時間の短い 3.2 分のピークが非イオン型のエダラボンであると予想される。図 2-9 の点線は亜硫酸水素ナトリウム添加後のクロマトグラムであり、3.2 分と 3.9 分のピークは減少し、3.5 分と 4.1 分

のピークが増加した。このことは、亜硫酸水素ナトリウムの添加により、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ことに合致する。3.5分ピークが4.1分ピークより多いので、前者が亜硫酸付加体1で後者が亜硫酸付加体2と考えられる。亜硫酸付加体1は分子内水素結合により、亜硫酸付加体2より極性が低いと想定されることと矛盾が無い。

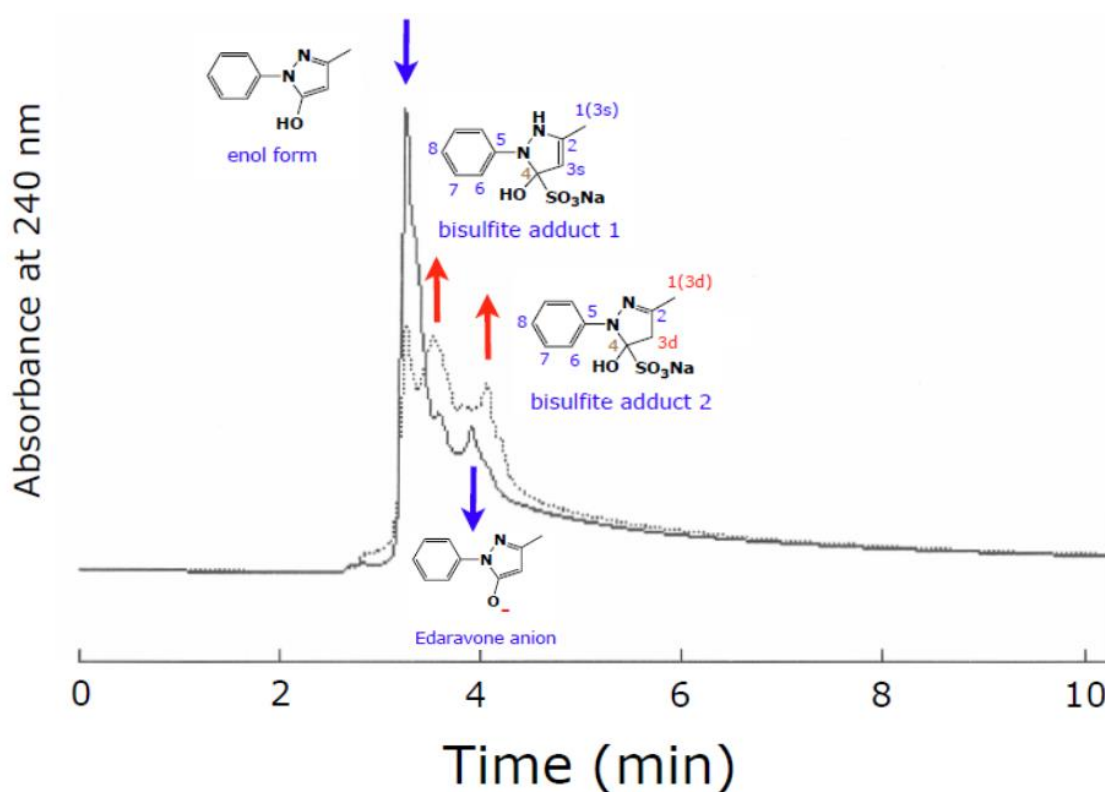


図 2-9 HPLC (アミノカラム) によるエダラボン及び亜硫酸水素ナトリウムの相互作用の検討

UV detection: λ 240 nm

Column: SUPELCOSIL LC-NH₂, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm

Mobile phase: 40 mM NaH₂PO₄/methanol/CH₃CN = 5/45/50, v/v

Flow rate: 1.0 mL/min

2-4 まとめ

図 2-10 で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傾向にあることを要約した。エダラボンラジカルは分解物の前駆体になる。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添加は、図 2-10 での平衡を右側に寄せること及び亜硫酸付加体を形成することから、エダラボンアニオン濃度を下げることに有効である。しかしながら、この反応は平衡反応であること及びエダラボンアニオンを完全に除くことは困難であることから、この方法には限界が有る。

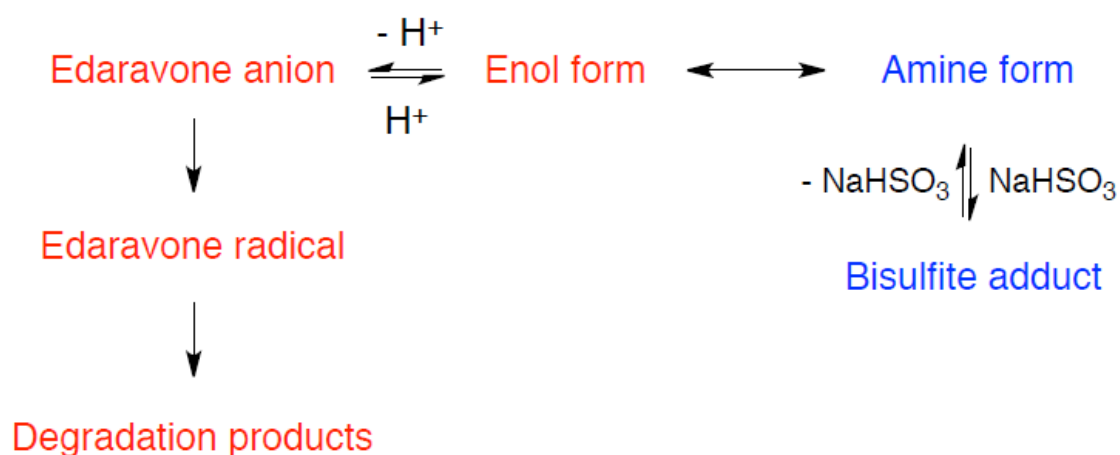


図 2-10 エダラボンに対する亜硫酸水素ナトリウムの安定化作用機序

第3章 エダラボン水溶液の安定化剤とその作用機序ーグルタチオン²³⁾

3-1 エダラボンのさらなる安定化の標的

第2章で、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、安定性の改善には、エダラボンアニオンの濃度を下げることがあることを述べた。そして、亜硫酸水素ナトリウムの添加が、平衡をケト型、アミン型に寄せること及び亜硫酸付加体を形成することから、エダラボンアニオン濃度を下げることが有効ではあるが限界が有ることを述べた。

本章では、エダラボンアニオンを安定化してエダラボンラジカル生成を抑制する目的で、市販製剤に亜硫酸水素ナトリウムと共に用いられているシステインを対照に、より優れた安定化剤を見出すべく、チオール基を有するグルタチオンに焦点して検討した結果を述べる。

加えて、米国 Food and Drug Administration (FDA) が指摘する、アナフィラキシー症状や感受性の高い人に致命的なアレルギー反応を引き起こす可能性のある亜硫酸水素ナトリウム⁴⁵⁾の使用を回避して、安定なエダラボン水溶液の開発を目指した。

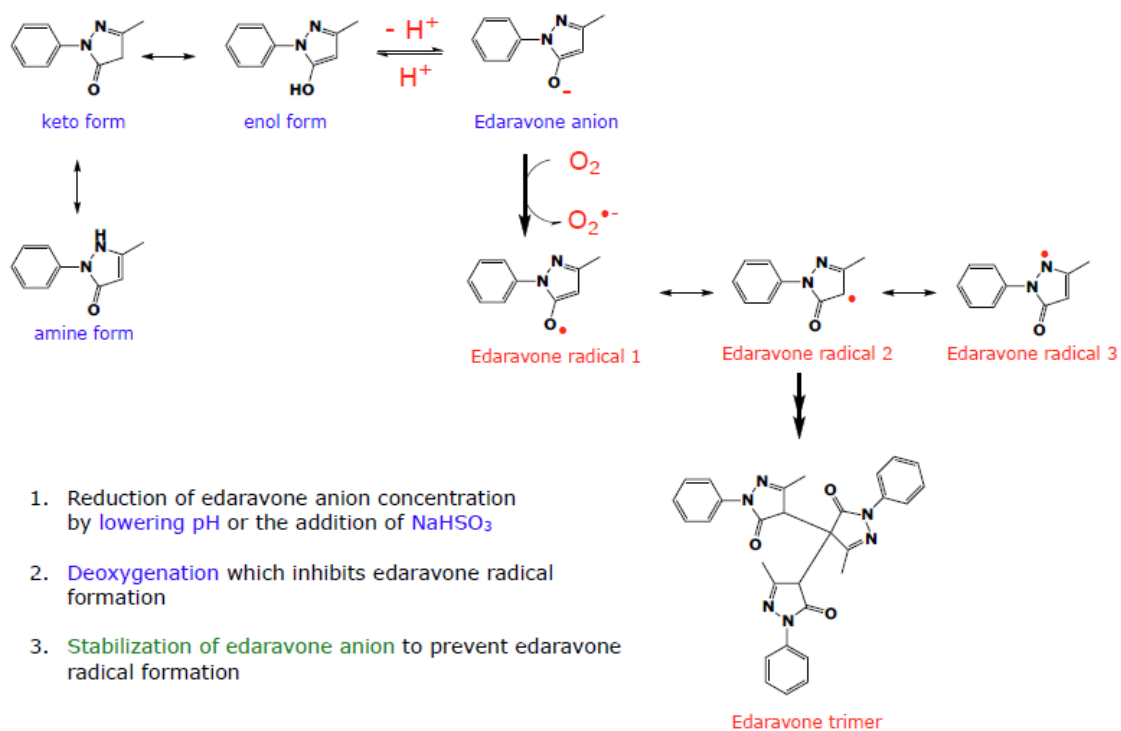


図 3-1 エダラボン水溶液の安定化方法

3-2 実験方法

試薬

エダラボン, グルタチオン, システイン, 亜硫酸水素ナトリウム, フェニルヒドラジンは市販の特級品を用いた。

エダラボン: MW 174.20, Lot CTK0084, Wako, Japan

グルタチオン(還元型): MW 307.33, Lot SAH3222, Wako, Japan

L-システイン: MW 121.16, Lot AWR0118, Wako, Japan

亜硫酸水素ナトリウム: MW 104.06, Lot PAR2104, Wako, Japan

塩化フェニルヒドラジニウム(フェニルヒドラジン塩酸塩): MW 144.60, Lot ECK2025,

Wako, Japan

3-2-1 グルタチオン添加によるエダラボンの安定化効果の検討(1)

エダラボン 30 mg, 亜硫酸水素ナトリウム 20 mg, グルタチオン(還元型)25.4 mg, L-システイン 10 mgを各々水で溶解した。エダラボンの溶解に際しては, 飽和溶解度 2 mg/mL の溶液を得るべく, 1 N 水酸化ナトリウム溶液を滴下して溶解した後, 1 N 塩酸で pH を 5~6 に調整した。

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+グルタチオン

エダラボン+システイン

エダラボン+亜硫酸水素ナトリウム+グルタチオン

を各々全量 20 mL に調製し, スクリュー管に充填し, 密栓しサンプルとした。

この際のモル濃度は次の如くである。

エダラボン:8.61 mM

亜硫酸水素ナトリウム:9.61 mM

グルタチオン:4.13 mM

システイン:4.13 mM

サンプル容器内は空気雰囲気下のまま, 60 °Cで保存し, 着色, 不溶性異物, エダラボン濃度を経時的に観察した。エダラボン濃度は液体クロマトグラフ (High Performance Liquid Chromatography:HPLC)法により, サンプル調製時(0 週)のエダラボンのピーク面積値に対する 2, 4 週間後のピーク面積の比から濃度を測定した。

HPLC の機器と測定条件は次の如くである。

UV detection: λ 295 nm, 875-UV, Japan spectroscopic, Japan

Column: CAPCELL PAK ADME, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm, Shiseido, Japan

Mobile phase: 40 mM NaH₂PO₄/methanol = 40/60, v/v

Flow rate: 0.5 mL/min, LC-20AD, Shimadzu, Japan

3-2-2 グルタチオン添加によるエダラボンの安定化効果の検討(2)

市販されている先発品のエダラボン注射剤は、エダラボン 30 mg, 亜硫酸水素ナトリウム 20 mg, L-システイン 10 mg を成分に、アンプルは液量 20 mL で製剤化されていることを踏まえ、次の如くサンプルを調製し、室温及び 60 °C で保存し、3-2-1 と同様の方法で着色、不溶性異物、エダラボン濃度を経時的に観察した。

エダラボン 30 mg + 亜硫酸水素ナトリウム 20 mg (液量 20 mL)

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 (液量 20 mL)

エダラボン 30 mg + 亜硫酸水素ナトリウム 20 mg + グルタチオン 25.4 mg (液量 20 mL)

3-2-3 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

3-2-2 で得られたサンプルを 60 °C 及び室温で保存し、フェニルヒドラジンの有無を HPLC 法により検討した。フェニルヒドラジン塩酸塩の 1, 10, 100 µM を標準品に用い、その保持時間に該当するピークの存在の有無を観察すると共に、サンプルとフェニルヒドラジンを等液量混和して(スパイク)、当該ピークがフェニルヒドラジンであることを確認した。HPLC の条件は次の如くである。

UV detection: λ 280 nm, 875-UV, Japan spectroscopic, Japan

Column: CAPCELL PAK ADME, 5 µm, 4.6 mm I.D. × 250 mm, Shiseido, Japan

Mobile phase: 40 mM NaH₂PO₄/methanol = 40/60, v/v

Flow rate: 0.5 mL/min, LC-20AD, Shimadzu, Japan

3-2-4 グルタチオン(GSH)及び酸化型グルタチオン(GSSG)の測定

3-2-1と同様に調製したエダラボン(8.61 mM) + グルタチオン(4.13 mM)の水溶液調製直後及び 60 °C, 4 週間保存後に, グルタチオン(GSH)及び酸化型グルタチオン(GSSG)の測定を行った。HPLC の条件は次の如くである。

UV detection: λ 210 nm, SPD-20AV, Shimadzu, Japan

Column: CAPCELL PAK C18 column, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm, Shiseido, Tokyo, Japan

Mobile phase: 3 % methanol aqueous solution containing 0.05% trifluoroacetic acid

Flow rate: 1.0 mL/min, LC-20AD, Shimadzu, Japan

3-2-5 グルタチオン添加及び脱酸素(窒素置換)によるエダラボンの安定化効果の検討(1)

3-2-1, 3-2-2 に準じて, 液量 20mL のサンプルを次の如く調製した。

エダラボン + 亜硫酸水素ナトリウム + システイン (空気雰囲気下)

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 (脱酸素)

エダラボン + グルタチオン (空気雰囲気下)

各々のモル濃度は次の如くである。

エダラボン: 8.61 mM

亜硫酸水素ナトリウム: 9.61 mM

システイン: 4.13 mM

グルタチオン: 4.13 mM

脱酸素サンプルは, スクリュー管に水溶液を充填し, 窒素ガスを溶液内に吹き込み, 水溶液を脱気し, 容器内の空気を窒素で置換した後, 密栓しサンプルとした。

空気雰囲気下サンプルは、スクリー管に水溶液を充填した後、密栓しサンプルとした。

サンプルは、60 °C、4 週間保存し、着色、不溶性異物、エダラボン濃度を観察した。エダラボン濃度は液体クロマトグラフ法により、エダラボン標準品 8.61 mM のピーク面積値に対する 4 週間後のピーク面積の比から測定した。

また、3-2-3 に準じて、フェニルヒドラジンの有無を HPLC 法により確認した。

3-2-6 グルタチオン添加及び脱酸素(窒素置換)によるエダラボンの安定化効果の検討(2)

3-2-1 に準じて、次の如く水溶液を調製し、10mL の蓋付き耐熱ガラス管に充填し、脱酸素サンプルは、窒素ガスを溶液内に吹き込み、水溶液を脱気し、容器内の空気を窒素で置換した後、密栓しサンプルとし、空気雰囲気下サンプルは、密栓しサンプルとした。

エダラボン+グルタチオン(脱酸素)

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)

各々のモル濃度は次の如くである。

エダラボン:8.61 mM

グルタチオン:4.13 mM

亜硫酸水素ナトリウム:9.61 mM

サンプルは各々 n = 3 調製し、60 °C、4 週間保存し、着色、不溶性異物、エダラボン濃度を観察した。エダラボン濃度は液体クロマトグラフ法により、エダラボン標準品 8.61 mM のピーク面積値に対する 4 週間後のピーク面積の比から測定し、3 サンプルについて集計した。

3-2-7 グルタチオン添加及び脱酸素(窒素置換)によるエダラボンの安定化効果の検討(3)

3-2-1 に準じて、次の如く水溶液を調製し、10mL の蓋付き耐熱ガラス管に充填し、窒素ガスを溶液内に吹き込み、水溶液を脱気し、容器内の空気を窒素で置換した後、密栓しサンプルとした。

エダラボン(脱酸素)

エダラボン+グルタチオン(脱酸素)

各々のモル濃度は次の如くである。

エダラボン:8.61 mM

グルタチオン:0.86 mM(エダラボンの 1/10 モル濃度), 1.03 mM, 2.07 mM, 4.13 mM, 8.61 mM(エダラボンと等モル濃度)

サンプルは各々 n = 3 調製し、60 °C, 4 週間保存し、着色、不溶性異物、エダラボン濃度を観察した。エダラボン濃度は液体クロマトグラフ法により、エダラボン標準品 8.61 mM のピーク面積値に対する 4 週間後のピーク面積の比から測定し、3 サンプルについて集計した。

3-3 実験結果及び考察

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)

図 3-2A は 8.61 mM のエダラボン水溶液を 60 °C, 4 週間で保存した際の黄土色の着色及び黄色の不溶性異物であり、不溶性異物の大部分はエダラボントリマーであり、加えて少量のエダラボンから成ることを第 2 章で述べた。9.61 mM の亜硫酸水素ナトリウム添加(図 3-2B)及び 4.13 mM のグルタチオン添加(図 3-2C)は部分的に不溶性異物を抑制したが、4.13mM のシステイン添加(図 3-2D)では、黄土色の着色及

び黄色の不溶性異物が図 3-2A と同程度であり安定化効果を示さなかった。9.61 mM 亜硫酸水素ナトリウムと 4.13 mM グルタチオンの添加では不溶性異物は生じなかった(図 3-2E)。

60 °C, 4 週間保存後の残存エダラボン濃度の高い順に添加物を記すと, 亜硫酸水素ナトリウム+グルタチオン>グルタチオン>亜硫酸水素ナトリウム>システイン≒無添加であった(図 3-3)。エダラボン水溶液の安定化剤として, システインは機能せず, 一方, グルタチオンは有効であったことは驚くべきことであった。この明らかな差についての考察は後述する。

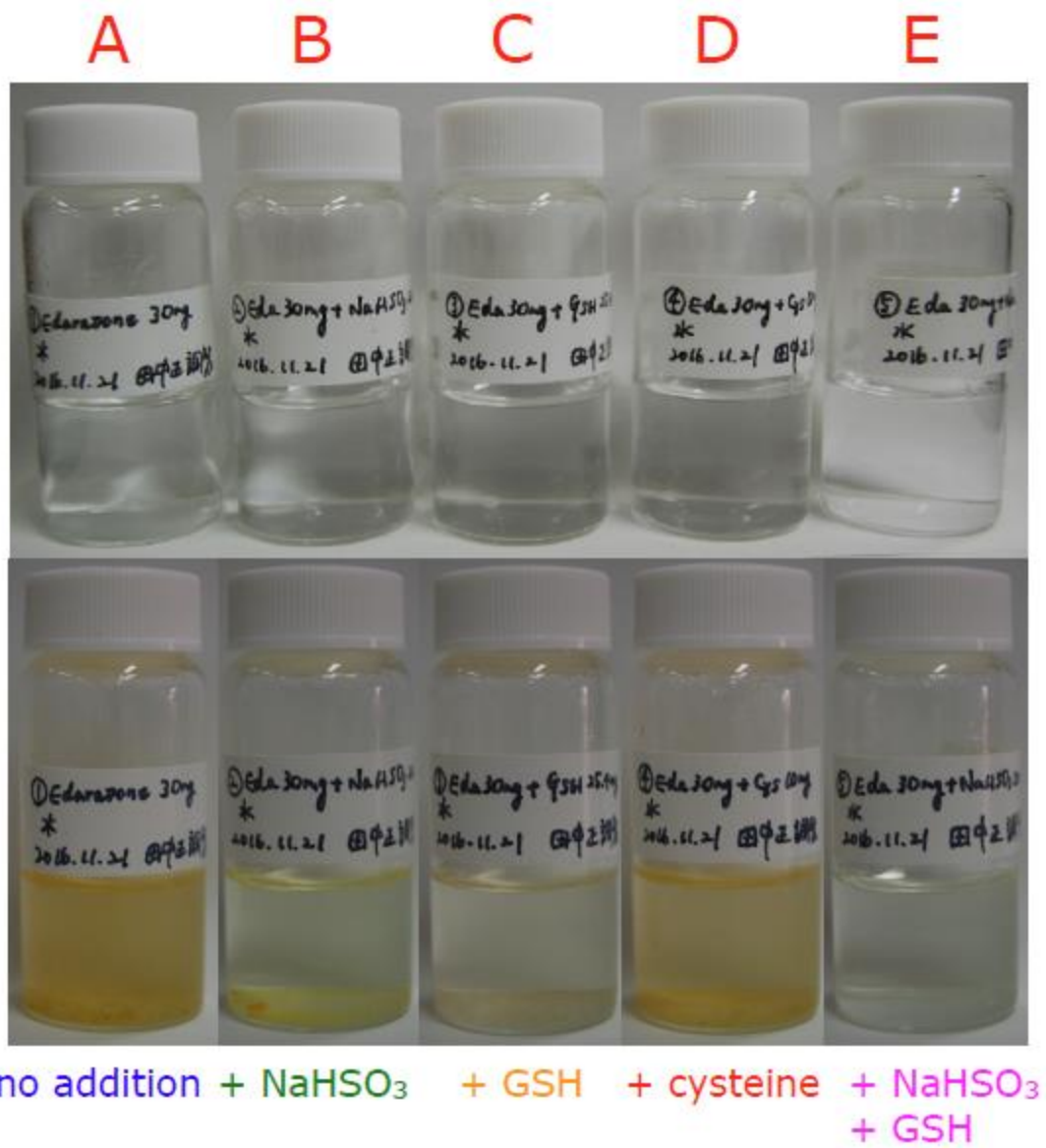


図 3-2 着色及び不溶性異物の推移(溶媒:水, 60 °C, 4 週間)

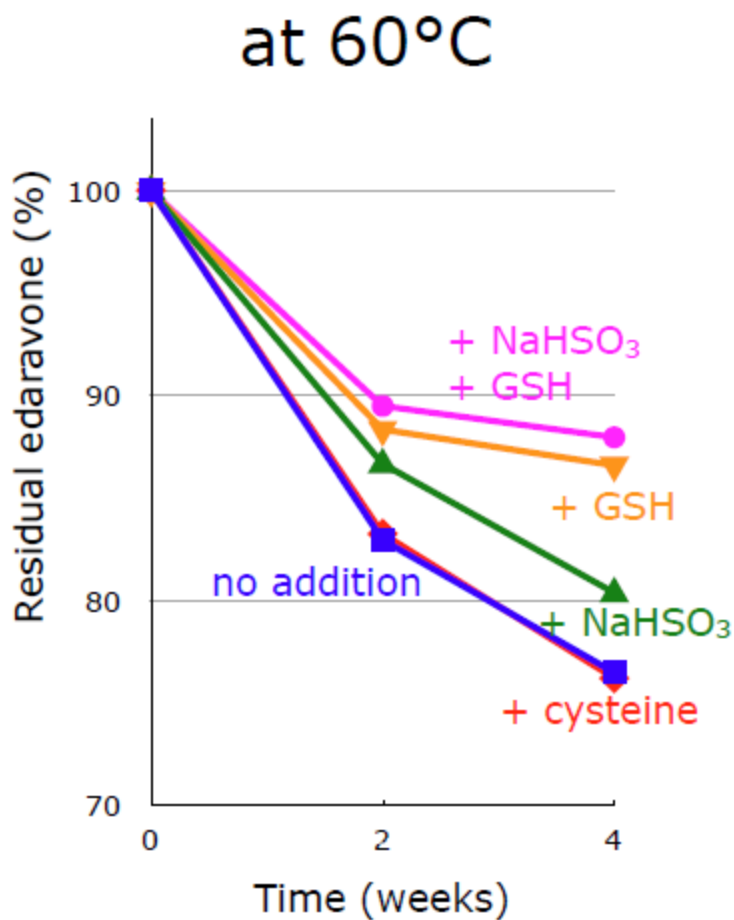


図 3-3 エダラボン濃度推移 (溶媒:水, 60 °C, 4 週間)

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)

室温で 2 年間、空気雰囲気下で保存した際の、残存エダラボン濃度の高い順に添加物を記すと、亜硫酸水素ナトリウム+グルタチオン>亜硫酸水素ナトリウム+システイン>亜硫酸水素ナトリウムの順であった(図 3-4)。この結果は、エダラボン水溶液の安定化剤として、システインよりグルタチオンが優れていることを確認させるものであった。また、亜硫酸水素ナトリウムとグルタチオンの組み合わせが、空気雰囲気下であるにも関わらず、エダラボンの分解を 1 年以上抑制することは注目すべきことであった。

at room temp.

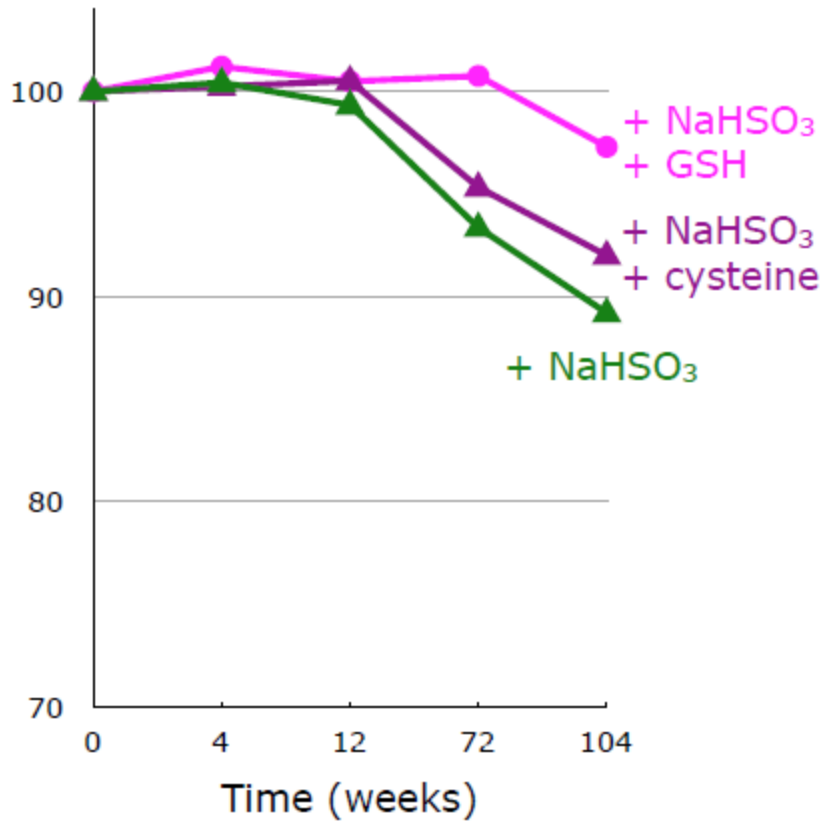


図 3-4 エダラボン濃度推移(溶媒:水, 20 mL, 添加物基剤:亜硫酸水素ナトリウム, 室温, 4-12-72-104 週間)

60 °Cで4週間保存した場合は, +亜硫酸水素ナトリウム, +亜硫酸水素ナトリウム+システインの順に不溶性異物の出現(図 3-5)と残存エダラボン濃度の低下(図 3-6)を認めた。

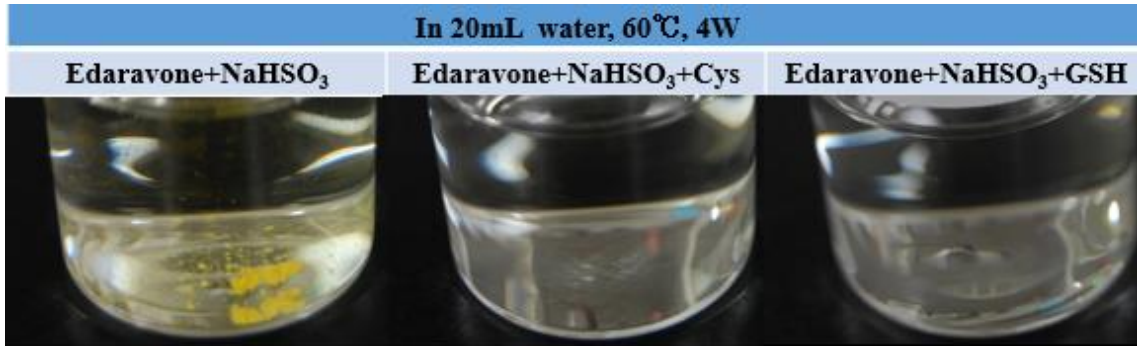


図 3-5 着色及び不溶性異物(溶媒:水, 添加物基剤:亜硫酸水素ナトリウム, 60 °C, 4 週間)

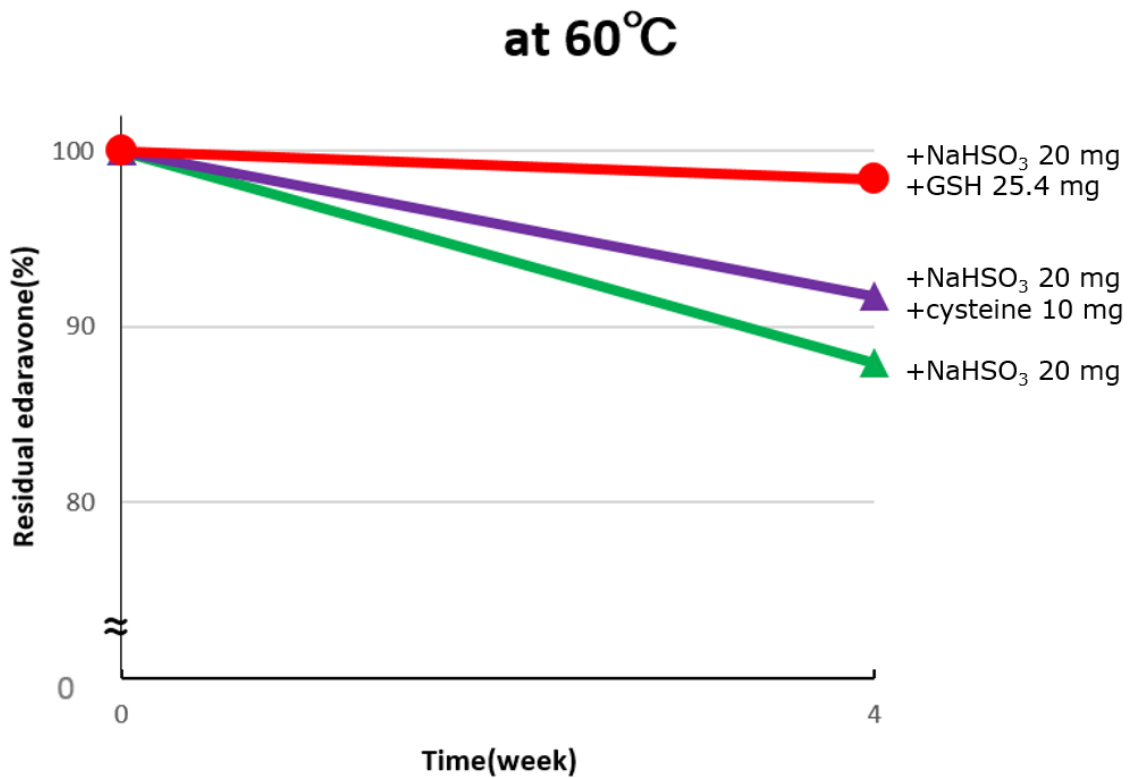


図 3-6 エダラボン濃度推移(溶媒:水, 添加物基剤:亜硫酸水素ナトリウム, 60 °C, 4 週間)

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

エダラボンはフェニルヒドラジンとアセト酢酸エチルから合成される²⁴⁾。もしもエダラボンが加水分解されると、潜在的に発癌性を有するフェニルヒドラジン²⁵⁾²⁶⁾が生じる。それ故に、保存中のフェニルヒドラジンの生成は抑制されるべきである。図 3-7 はエダラボン水溶液を空気雰囲気下で 60 °C, 5 週間保存後の、フェニルヒドラジン 10 μM スパイクの前後の HPLC クロマトグラムである。亜硫酸水素ナトリウム添加(図 3-7A)と亜硫酸水素ナトリウム+システイン(図 3-7B)はフェニルヒドラジンの生成を抑制していない。しかしながら、亜硫酸水素ナトリウム+グルタチオンをエダラボン水溶液に添加した場合はフェニルヒドラジンの生成は認められなかった(図 3-7C)。

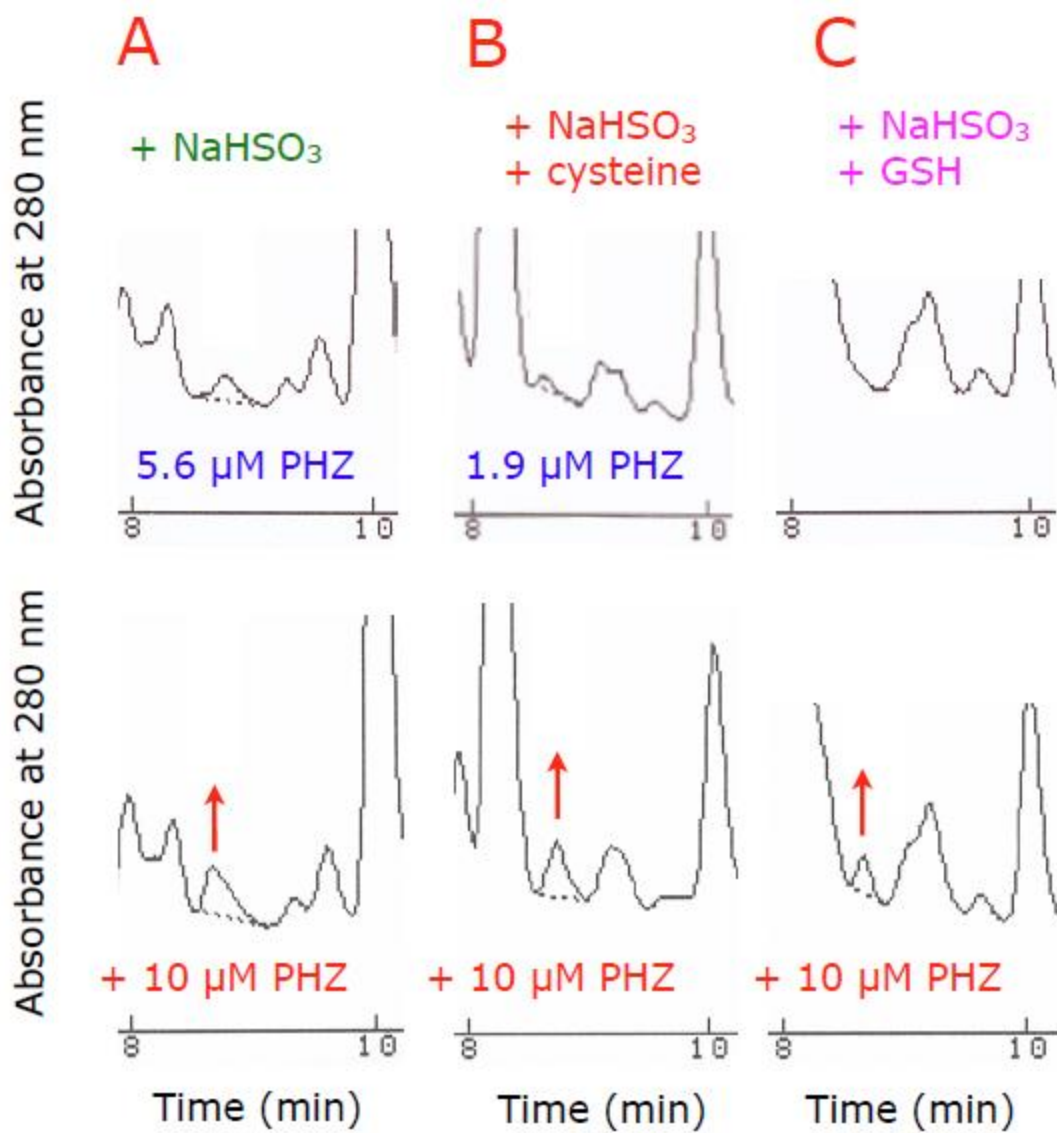


図 3-7 8.61 mM エダラボン水溶液を 60 °C, 5 週間, 空気雰囲気下で保存した場合のフェニルヒドラジンの生成

A: 9.61 mM 亜硫酸水素ナトリウム

B: 9.61 mM 亜硫酸水素ナトリウム + 4.13 mM システイン

C: 9.61 mM 亜硫酸水素ナトリウム + 4.13 mM グルタチオン

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

上記結果は、グルタチオンはエダラボンアニオンを安定化することが出来るが、一方、システインには出来ないことを示している。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る。そのためには、グルタチオンとエダラボンアニオンが図 3-8 に示したように、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。グルタチオンからの電子供与は、グルタチオンラジカル(GS \cdot)を与え、その結果、酸化型グルタチオン(GSSG)を生じる。実際、60 °C、4 週間保存後のグルタチオンを添加したエダラボン水溶液で GSSG の生成を確認した(図 3-9)。しかしながら、この考え方は、グルタチオンの他の分解物が検出されていることから、更に慎重に検討されるべきである(図 3-9)。

一方、システインは図 3-8 に示したように分子内水素結合を形作ることが出来るので、エダラボンアニオンとの分子間水素結合の確率を減少させる。しかし、グルタチオンは分子内水素結合を持つことは困難である。従って、水素結合の違いが原因であろうと考えられる。

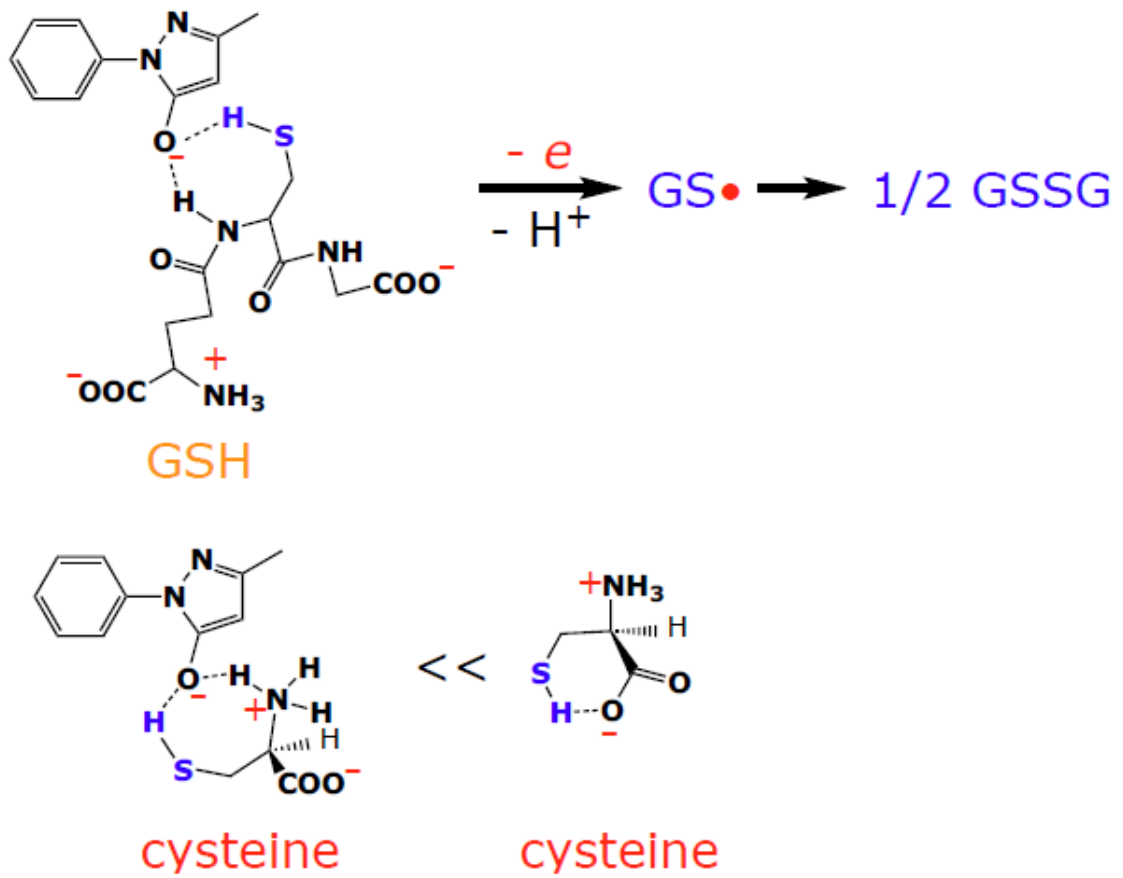


図 3-8 エダラボンアニオンとグルタチオンの分子間水素結合及びシステインの分子内水素結合

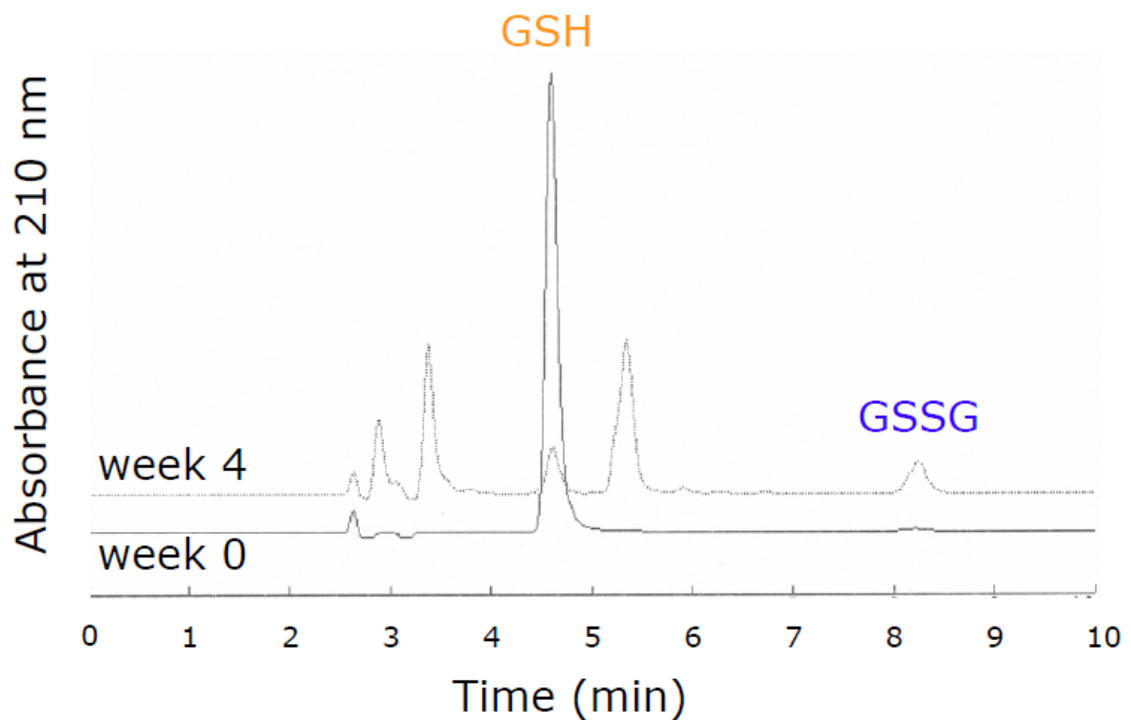


図 3-9 8.61 mM エダラボンと 4.13 mM グルタチオンを 60 °C, 4 週間, 空気雰囲気下で保存した場合のグルタチオンの減少及び酸化型グルタチオンの生成

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)

上記の結果はグルタチオンと亜硫酸水素ナトリウムの組み合わせが空気雰囲気下ですら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を示している。しかしながら, 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いる。グルタチオンはエダラボンの安定性とフェニルヒドラジンの抑制の点から有用なので, グルタチオンと脱酸素を組み合わせた。脱酸素は窒素ガスで脱気することで達成した。

8.61 mM のエダラボン水溶液を, 9.61 mM 亜硫酸水素ナトリウム+4.13 mM シス

テイン(図 3-10A), 9.61 mM 亜硫酸水素ナトリウム+4.13mM グルタチオン(図 3-10B), 4.13mM グルタチオン(図 3-10C 及び 10D)の存在下で, 10C は窒素置換下で, その他は空気雰囲気下で, 60 °C, 4 週間保存し, 不溶性異物の比較を行った。グルタチオン添加と脱酸素の結果は明確で, 不溶性異物の生成は無く(図 3-10C), エダラボン残存量は他と比べて最高値であった(図 3-11)。更に, フェニルヒドラジンも生成しなかった(図 3-12)。

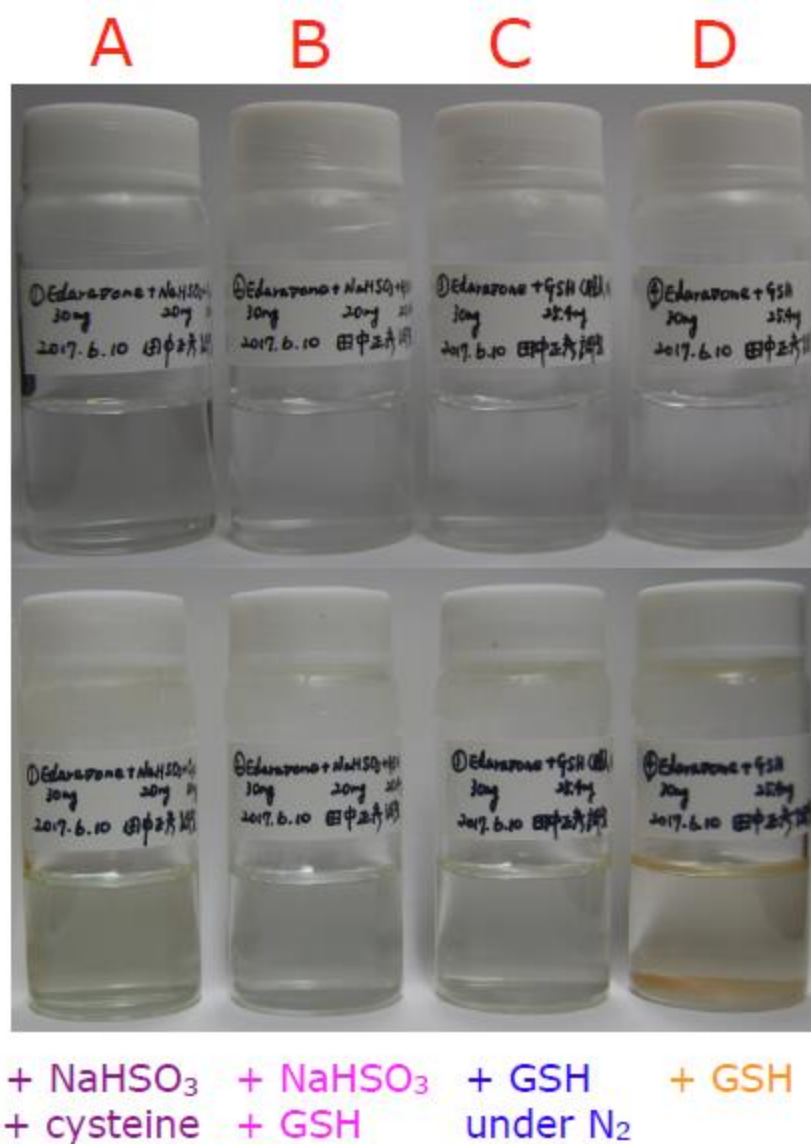


図 3-10 8.61 mM エダラボン水溶液を 60 °C, 4 週間, 保存した場合の不溶性異物の生成

- A: +9.61 mM 亜硫酸水素ナトリウム+4.13 mM システイン(空気雰囲気下)
- B: +9.61 mM 亜硫酸水素ナトリウム+4.13 mM グルタチオン(空気雰囲気下)
- C: +4.13 mM グルタチオン(窒素置換)
- D: +4.13 mM グルタチオン(空気雰囲気下)

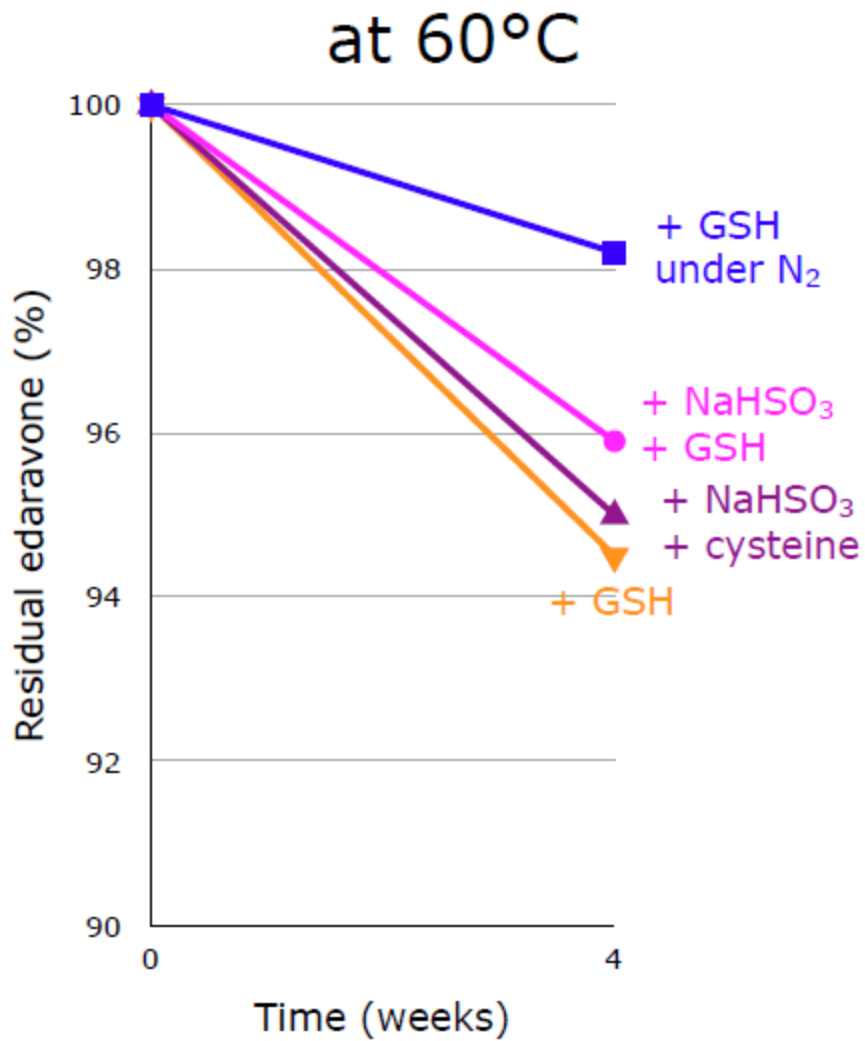


図 3-11 8.61 mM エダラボン水溶液を 60 °C, 4 週間, 保存した場合のエダラボン濃度変化

- ▲: +9.61 mM 亜硫酸水素ナトリウム+4.13 mM システイン(空気雰囲気下)
- : +9.61 mM 亜硫酸水素ナトリウム+4.13 mM グルタチオン(空気雰囲気下)
- : +4.13 mM グルタチオン(窒素置換)
- ▼: +4.13 mM グルタチオン(空気雰囲気下)

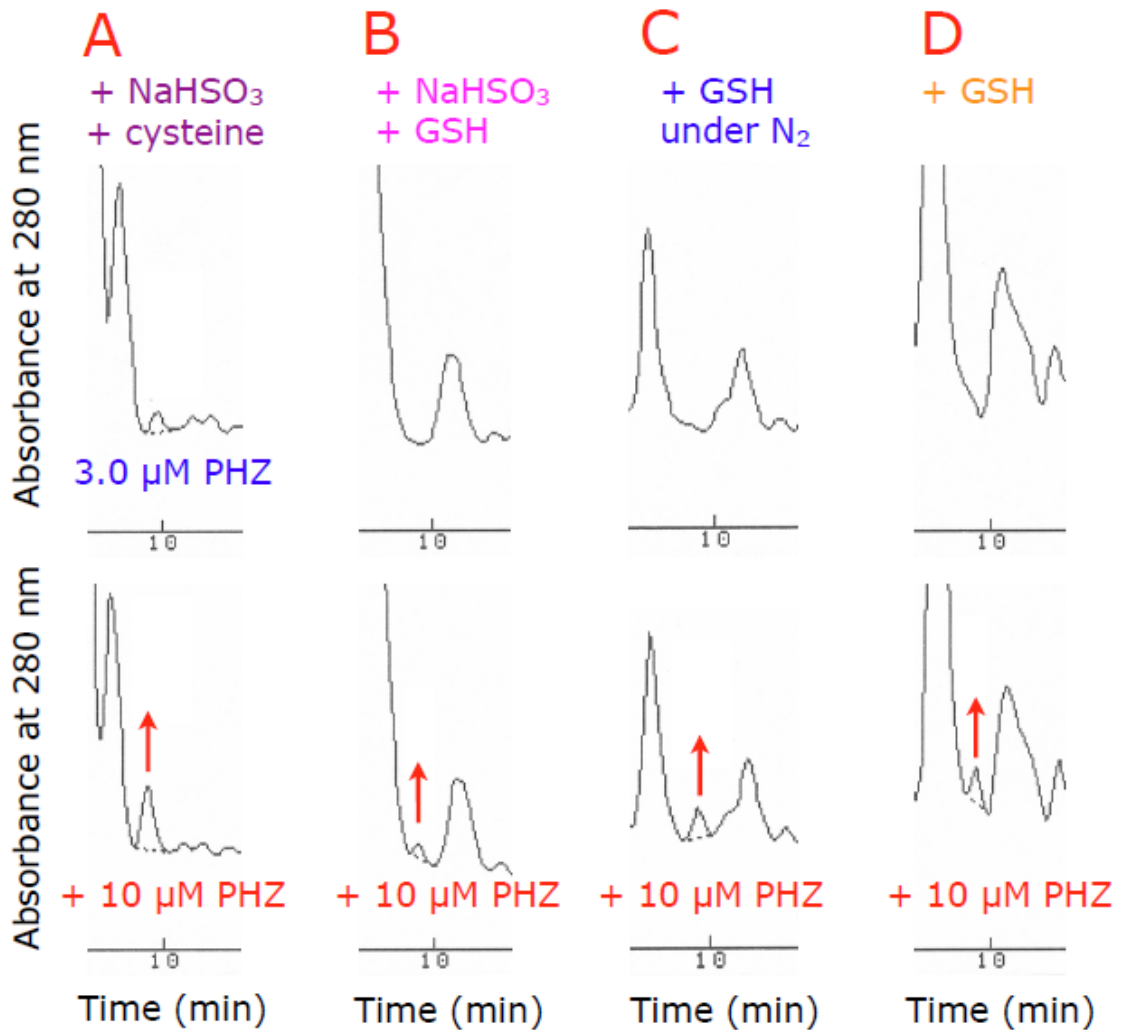


図 3-12 8.61 mM エダラボン水溶液を 60 °C, 4 週間, 保存した場合のフェニルヒドラジンの生成

A: +9.61 mM 亜硫酸水素ナトリウム+4.13 mM システイン(空気雰囲気下)

B: +9.61 mM 亜硫酸水素ナトリウム+4.13 mM グルタチオン(空気雰囲気下)

C: +4.13 mM グルタチオン(窒素置換)

D: +4.13 mM グルタチオン(空気雰囲気下)

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(2)

着色を表 3-1 に, 不溶性異物を表 3-2 に, エダラボン濃度を図 3-13 に示した。

グルタチオン添加と脱酸素の結果は明確で, 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。

表 3-1 着色(60 °C, 4 週間後, 液量 10 mL)

サンプル	着色の程度
エダラボン+グルタチオン(窒素置換)	—
エダラボン+グルタチオン+亜硫酸水素ナトリウム(空気雰囲気下)	—
エダラボン+グルタチオン(空気雰囲気下)	±

— 無色澄明

± 極く僅かな着色

+ 僅かな着色

++ 薄い着色

+++ 明らかな着色

表 3-2 不溶性異物(60 °C, 4 週間後, 液量 10 mL)

サンプル	不溶性異物の程度
エダラボン+グルタチオン(窒素置換)	—
エダラボン+グルタチオン+亜硫酸水素ナトリウム(空気雰囲気下)	—
エダラボン+グルタチオン(空気雰囲気下)	+

- 不溶性異物なし
- ± 極く僅かな不溶性異物
- + 僅かな細かい不溶性異物
- ++ 細かい不溶性異物
- +++ 大きな塊または結晶状の不溶性異物

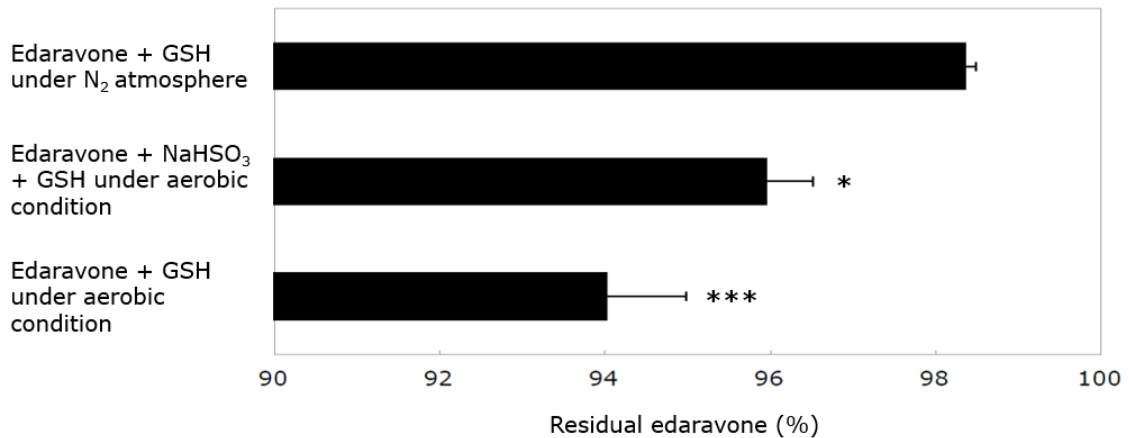


図 3-13 エダラボン濃度(60 °C, 4 週間後, 液量 10 mL) 平均値+SD, n=3

一元配置分散分析:p = 0.0006

Schffe 型の多重比較:エダラボン+グルタチオン(窒素置換)に対する群間差

* p = 0.0122, *** p = 0.0006

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)

エダラボン単独の脱酸素(窒素置換)では、白色及び微黄色の雲状の沈殿型及び浮遊型の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脱酸素(窒素置換)では不溶性異物の生成は無かった。着色はいずれのサンプルにも無かった。

図3-14にエダラボン残存濃度を示した。グルタチオン濃度0.86~8.61mMの範囲でエダラボン残存濃度は96.5~99.2%と高値であり、エダラボンのモル濃度8.61mMの1/10程度のグルタチオン添加と脱酸素(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。

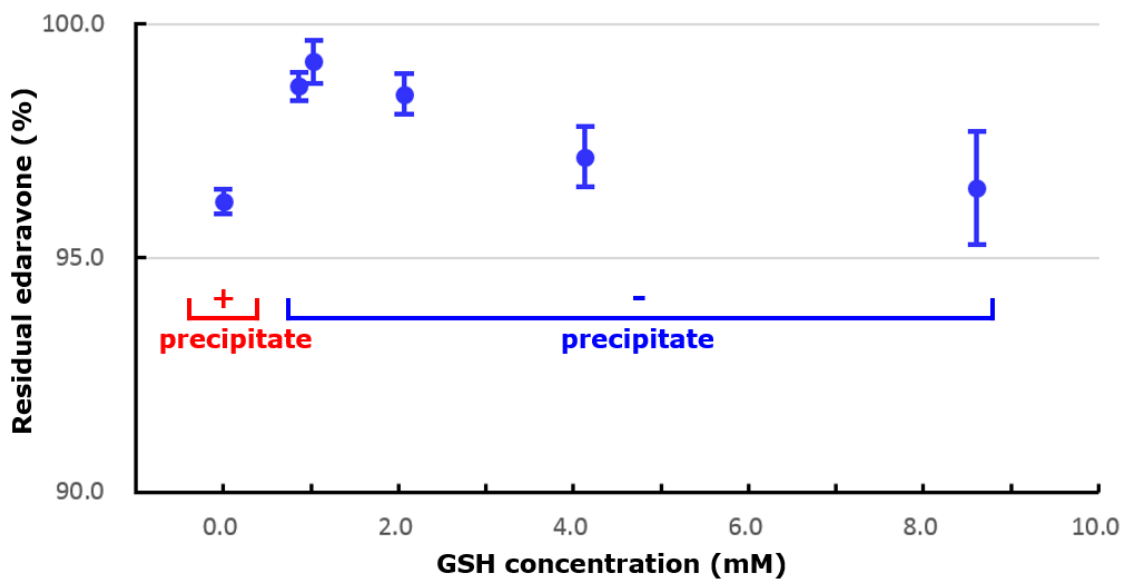


図3-14 GSH添加濃度とエダラボン残存濃度の関係(60 °C, 4週間後, 液量10 mL)

平均値±SD, n=3

3-4 まとめ

表 3-3 に、エダラボン水溶液の安定化方法の効果を要約した。

グルタチオンの添加はエダラボン水溶液の安定化に有効であったが、システインは無効であった。このことは、グルタチオンとエダラボンアニオンの間の分子間水素結合によるものと考えられた。一方、システインは分子内の水素結合がより有利であるため、システインとエダラボンアニオンの水素結合は起こりにくい。さらに、これらの違いが、グルタチオン添加がフェニルヒドラジンを抑制し、システイン添加が抑制しなかったことにも影響しているものと考えられる。グルタチオンと亜硫酸水素ナトリウムの組み合わせは、空気雰囲気下にも関わらず、室温で 1 年間以上、エダラボン水溶液を安定化した。

FDA の指摘を踏まえると、安定化剤に亜硫酸水素ナトリウムを使うことは好ましくない。そこで、グルタチオンと脱酸素を組み合わせることで、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。

表 3-3 エダラボン水溶液の安定化方法の効果

	efficacy
+ NaHSO ₃	△
+ cysteine	×
+ NaHSO ₃ + cysteine	△
+ GSH	○
+ NaHSO ₃ + GSH	◎
deoxygenation + GSH	◎

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(GSH)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。すなわち、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ことが予想された。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、GSHから電子を与えるので、GS[•]となり、さらにGSSG(酸化型グルタチオン)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。

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℃、4週間保存での安定性を維持し、潜在的発癌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。

引用文献

- 1) The edaravone acute brain infarction study group (chair: Otomo E.). Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction: Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis* 2003; **15**: 222-229.
- 2) 田中正彦: 脳保護薬(フリーラジカルスカベンジャー)エダラボン(ラジカット注 30 mg)の非臨床および臨床プロフィール. 日薬理誌 2002; **119**: 301-308.
- 3) The Writing Group on behalf of the Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group: Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 2017; **16**: 505-512.
- 4) <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm557102.htm>
- 5) https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209176lbl.pdf
- 6) Yamamoto Y, Kuwahara T, Watanabe K, Watanabe K: Antioxidant activity of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one. *Redox Rep* 1996; **2**: 333-338.
- 7) Yamamoto Y, Yanagisawa M, Tak NW, Watanabe K, Takahashi C, Fujisawa A, Kashiba M, Tanaka M: Repeated edaravone treatment reduces oxidative cell damage

- in rat brain induced by middle cerebral artery occlusion. *Redox Rep* 2009; **14**: 251-258.
- 8) Fujisawa A, Yamamoto Y. Edaravone, a potent free radical scavenger, reacts with peroxynitrite to produce predominantly 4-NO-edaravone. *Redox Rep* 2016; **21**: 98–103.
- 9) Nagase M, Yamamoto Y, Miyazaki Y, Yoshino H. Increased oxidative stress in patients with amyotrophic lateral sclerosis and the effect of edaravone administration. *Redox Rep* 2016; **21**: 104-112.
- 10) 日本薬局方 エダラボン注射液 ラジカット®注 30 mg 添付文書. 2001年4月国際誕生, 2001年6月販売開始, 承認番号 21300AMZ00377, 2015年6月改訂(第18版).
- 11) エダラボン注射剤 ラジカット®点滴静注バッグ 30 mg 添付文書. 2010年5月販売開始, 承認番号 22200AMX00224, 2015年6月改訂(第9版).
- 12) 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾロン-5-オンを含有する安定な注射剤. 特願昭 61-280022; 特許第 2082773 号.
- 13) 新薬承認情報集 平成13年 No.11 エダラボン[ラジカット注 30 mg]. 日本薬剤師研修センター. 2001; **11**: 146-147.

- 14) The Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA): Information for Approved Products. 2001; <http://www.pmda.go.jp/drugs/2001/P200100011/index.html>; 4-4: 146-147.
- 15) 山崎啓之, 石黒貴子, 瀬尾量: エダラボン注射剤における先発医薬品および後発医薬品のラジカル消去活性比較. 新薬と臨床 2011; **60**: 2413-2419.
- 16) 吉田研二, 小林正和, 斎藤秀夫, 鈴木太郎, 吉田浩二, 小笠原邦昭: エダラボン製剤の先発医薬品とジェネリック医薬品の 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl 吸光度法によるラジカル消去能比較. 脳卒中 2013; **35**: 375-377.
- 17) Tanaka M, Sugimura N, Fujisawa A, Yamamoto Y. Stabilizers of edaravone aqueous solution and their action mechanisms. 1. Sodium bisulfite. *J Clin Biochem Nutr*, in press.
- 18) Yamamoto Y, Brodsky MH, Baker JC, Ames BN. Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1987; **160**: 7-13.
- 19) Watanabe K, Watanabe K, Hayase T. Radical scavenging mechanism of MCI-186. *Jpn Pharmacol Ther* 1997; **25**: s1699–s1707.

- 20) Schulz M, Meske M. Free radical reactions of N-heterocyclic compounds. XI. Reaction of 3-methyl-pyrazolin-5-ones with phenoxy radicals. *J Prakt Chem* 1993; **93**: 607-615.
- 21) Russel A, Kenyon RL, Pseudoionone. *Organic Syntheses* 1943; **23**: 78-80.
- 22) Buntin SA, Heck RF. 2-Methyl-3-phenylpropanal. *Organic Syntheses* 1983; **82**: 82-83.
- 23) Tanaka M, Motomiya S, Fujisawa A, Yamamoto Y. Stabilizers of edaravone aqueous solution and their action mechanisms. 2. Glutathione. *J Clin Biochem Nutr*, in press.
- 24) Knorr L. Einwirkung von Acetessigester auf Phenylhydrazin. *Ber Deut Chem Ges* 1883; **16**: 2597–2599.
- 25) Clayson DB, Biancifiori C, Milia U, and Giornelli-Santilli FE, The induction of pulmonary tumours in BALB/c/Cb/Se mice by derivatives of hydrazines. In: Ed. Severi L ed. *Lung Tumours in Animals*. Rome: Univ Perugia, Dept Cancer Res, 1966: 869-880.
- 26) Toth B, Shimizu H. Tumorigenic effect of chronic administration of benzylhydrazine dihydrochloride and phenylhydrazine hydrochloride in Swiss mice. *Z Krebsforsch* 1976; **87**: 267-273.

業績

研究歴

1980年4月1日～1981年3月31日

慶応義塾大学工学部応用化学科で合成脂肪酸の分析について研究

1981年4月1日～1983年3月31日

慶応義塾大学工学研究科で分子篩による高度不飽和脂肪酸エステルの濃縮について研究

2014年4月1日～2017年9月14日

東京工科大学大学院バイオ・情報メディア研究科専攻博士後期課程でエダラボン水溶液の安定化剤とその作用機序について研究

職歴

1983年5月20日～1996年4月16日

三菱化成工業株式会社・三菱化成株式会社(社名変更)・三菱化学株式会社(合併)で選択的抗トロンビン薬アルガトロバンを開発(慢性動脈閉塞症, 脳血栓症急性期)

1987年3月1日～2001年4月4日

三菱化成工業株式会社・三菱化成株式会社(社名変更)・三菱化学株式会社(合併)・三菱東京製薬株式会社(合併)でフリーラジカル消去薬エダラボンを開発(脳梗塞急性期)

2001年9月20日～2015年6月26日

三菱東京製薬株式会社・三菱ウェルファーマ株式会社(合併)・田辺三菱製薬株式会社(合併)でフリーラジカル消去薬エダラボンを開発(筋萎縮性側索硬化症:ALS)

受賞歴

2003年3月26日 平成15年度 日本薬学会創薬科学賞受賞

「フリーラジカル消去作用を有する脳保護剤エダラボンの開発」

原著論文

1) Yoshiro Abe, Masahiko Tanaka. Concentration of ethyl icosapentaenoate from Japanese sardine oil by molecular sieve column. *Fette Seifen Anstrichmittel* 1984; **86**: 8-10.

2) 柴田久雄, 新井重紀, 井澤美苗, 村崎光邦, 高松康雄, 井澤修, 高橋千寿子, 田中正彦. MCI-186(Edaravone)の第I相臨床試験: 単回および反復投与試験における安全性と薬物動態の検討. *臨床薬理* 1998; **29**: 863-876.

3) Kazutoshi Watanabe, Yasuhiro Morinaka, Yoshio Hayashi, Masaki Shinoda, Hiroyoshi Nishi, Nobuko Fukushima, Toshiaki Watanabe, Akira Ishibashi, Satoshi Yuki, Masahiko Tanaka. 5-Aryl-imidazolin-2-ones as a scaffold for potent antioxidant and memory-improving activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; **18**: 1478-1483.

4) Yorihiro Yamamoto, Makoto Yanagisawa, Nyou Wei Tak, Kazutoshi Watanabe, Chizuko Takahashi, Akio Fujisawa, Misato Kashiba, Masahiko Tanaka. Repeated

edaravone treatment reduces oxidative cell damage in rat brain induced by middle cerebral artery occlusion. *Redox Rep* 2009; **14**: 251-258.

5) The Writing Group* on behalf of the Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 2017; **16**: 505-512.

*Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Writing Group: Koji Abe, Masashi Aoki, Shoji Tsuji, Yasuto Itoyama, Gen Sobue, Masanori Togo, Chikuma Hamada, Masahiko Tanaka, Makoto Akimoto, Kazue Nakamura, Fumihiro Takahashi, Kazuoki Kondo, Hiide Yoshino.

6) Koji Abe, Yasuto Itoyama, Shoji Tsuji, Gen Sobue, Masashi Aoki, Manabu Doyu, Chikuma Hamada, Masanori Togo, Takatomo Yoneoka, Masahiko Tanaka, Makoto Akimoto, Kazue Nakamura, Fumihiro Takahashi, Kazuoki Kondo, Hiide Yoshino: A post-hoc subgroup analysis of outcomes in the first phase 3 clinical study of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2017; **18**: 11-19.

7) The Writing Group* on behalf of the Edaravone (MCI-186) ALS 17 Study Group: Exploratory double-blind, parallel-group, placebo-controlled extension study of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2017; **18**: 20-31.

*Edaravone (MCI-186) ALS 17 Study Writing Group: Koji Abe, Yasuto Itoyama, Shoji

Tsuji, Gen Sobue, Masashi Aoki, Manabu Doyu, Chikuma Hamada, Masahiko Tanaka, Makoto Akimoto, Kazue Nakamura, Hiroshi Naito, Aiko Murakami, Fumihiro Takahashi, Kazuoki Kondo, Hiide Yoshino.

8) The Writing Group* on behalf of the Edaravone (MCI-186) ALS 18 Study Group: Exploratory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis (Japan ALS severity classification: Grade 3, requiring assistance for eating, excretion or ambulation). *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2017; **18**: 40-48.

*Edaravone (MCI-186) ALS 18 Study Writing Group: Koji Abe, Yasuto Itoyama, Shoji Tsuji, Gen Sobue, Masashi Aoki, Manabu Doyu, Chikuma Hamada, Masahiko Tanaka, Makoto Akimoto, Kazue Nakamura, Rie Sumii, Fumihiro Takahashi, Kazuoki Kondo, Hiide Yoshino.

9) The Writing Group* on behalf of the Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group: Open-label 24-week extension study of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2017; **18**: 55-63.

*Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Writing Group: Koji Abe, Masashi Aoki, Shoji Tsuji, Yasuto Itoyama, Gen Sobue, Masanori Togo, Chikuma Hamada, Masahiko Tanaka, Makoto Akimoto, Kazue Nakamura, Masaki Ueda, Kazuoki Kondo, Hiide Yoshino.

10) Masahiko Tanaka, Natsuhiko Sugimura, Akio Fujisawa, Yorihiro Yamamoto. Stabilizers of edaravone aqueous solution and their action mechanisms. 1. Sodium

bisulfite. *J Clin Biochem Nutr*, in press.

11) Masahiko Tanaka, Satsuki Motomiya, Akio Fujisawa, Yorihiro Yamamoto. Stabilizers of edaravone aqueous solution and their action mechanisms. 2. Glutathione. *J Clin Biochem Nutr*, in press.

総説(学会誌)

1) 田中正彦. 脳保護薬(フリーラジカルスカベンジャー)エダラボン(ラジカット注 30mg)の非臨床および臨床プロフィール. 日薬理誌 2002; **119**: 301-308.

2) 田中正彦. フリーラジカルスカベンジャー エダラボン: 脳保護薬へのアプローチ. *Medchem News* 2003; **13**: 13-17.

3) 渡邊和俊, 田中正彦. 新規脳保護剤エダラボンの化学的, 薬理的及び臨床的プロフィール. 応用薬理 2003; **65**: 79-88.

4) 渡辺俊明, 田中正彦, 渡邊和俊, 高松康雄, 戸部昭広. 脳保護剤(フリーラジカル消去剤)エダラボンの研究開発. *Yakugaku Zasshi* 2004; **124**: 99-111.

翻訳

1) 池田雅晴, 石塚秀実, 佐藤正章, 関根實, 武田ひとみ, 田中正彦, 東尾尚宏, 横川直躬. 脳卒中の評価と評価尺度に関する批判的検討. 薬理と治療 1993; **21**: 657-667.

総説(商業誌)

- 1) 田中正彦, 幸敏志. 急性期治療薬アルガトロバン, エダラボンの研究開発. *Bioclinica* 2005; **20**: 899-903.
- 2) 田中正彦, 幸敏志. 脳血栓症/脳梗塞急性期治療薬アルガトロバン, エダラボンの研究開発. *Bioclinica* 2008; **23**: 939-943.
- 3) 田中正彦. 脳保護薬(フリーラジカルスカベンジャー)エダラボンのプロフィール. *Medical Science Digest* 2008; **34**: 419-421.

学会発表

- 1) 渡辺俊明, 田中正彦. フリーラジカル消去作用を有する脳保護剤エダラボンの開発. 創薬薬理フォーラム(2001年6月5日, 東京)
- 2) 田中正彦. 脳保護剤(フリーラジカルスカベンジャー)エダラボンの基礎薬理ならびに臨床プロフィール. 創薬セミナー(2002年7月25日, 八ヶ岳)
- 3) 渡辺俊明, 戸部昭広, 渡辺和俊, 高松康雄, 田中正彦. フリーラジカル消去作用を有する脳保護剤エダラボンの開発. 創薬科学賞受賞講演(2003年3月28日, 長崎)
- 4) 田中正彦, 渡辺俊明. 脳保護薬 ラジカット(エダラボン)～フリーラジカル消去薬の発見とその研究開発～. 医学会総会記念シンポジウム(2003年4月5日, 博多)

- 5) 田中正彦. 脳保護薬へのアプローチーFree Radical Scavenger Edaravoneー. フォーラム富山「創薬」(2008年5月27日, 富山)

- 6) 田中正彦. フリーラジカルスカベンジャー エダラボン(MCI-186)による筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する臨床開発. ナノメディシン国際シンポジウム(2012年11月30日, 松江)

- 7) 田中正彦. 脳保護薬へのアプローチ フリーラジカルスカベンジャー ラジカット. 第43回日本救急医学会総会・学術集会(2015年10月22日, 東京)

- 8) 田中正彦. MCI-186(エダラボン)の筋萎縮性側索硬化症(ALS)治療薬としての開発. 第4回シンポジウム 創薬イノベーション人材の育成を目指して～難病克服のエコシステムを探る～(2015年10月29日, 東京大学)

大学講義

東京大学

- 1) 田中正彦. 脳保護薬へのアプローチーFree Radical Scavenger Edaravoneー.(2003年4月17日, 東京大学薬学部)

- 2) 田中正彦. 脳保護薬へのアプローチーFree Radical Scavenger Edaravoneー.(2004年5月20日, 東京大学薬学部)

- 3) 田中正彦. 脳保護薬へのアプローチーFree Radical Scavenger Edaravoneー臨床開発最前線<臨床試験・承認そして育薬>. 平成17年度創薬科学講義(2005年6

月 16 日, 東京大学薬学部)

4) 田中正彦. 脳保護薬へのアプローチ—Free Radical Scavenger Edaravone—. 平成 18 年度創薬科学講義(2006 年 5 月 11 日, 東京大学薬学部)

東京理科大学

1) 田中正彦. 新薬開発論エダラボン(ラジカット)の開発と評価指標.(2003 年 7 月 12 日, 東京理科大学薬学部)

九州大学

1) 田中正彦. レドックス医薬科学特論 創薬企業における臨床試験・承認そして育薬 脳保護薬へのアプローチ—Free Radical Scavenger Edaravone—. (2004 年 11 月 24 日, 九州大学薬学部)

日本大学

1) 田中正彦. 医薬品評価学特論 臨床開発最前線<臨床試験・承認そして育薬> 脳保護薬へのアプローチ—Free Radical Scavenger Edaravone—. (2005 年 5 月 7 日, 日本大学薬学部)

2) 田中正彦. 医薬品評価学特論 臨床開発最前線<臨床試験・承認そして育薬> 脳保護薬へのアプローチ—Free Radical Scavenger Edaravone—. (2007 年 4 月 21 日, 日本大学薬学部)

- 3) 田中正彦. 医薬品評価学特論 臨床開発最前線<臨床試験・承認そして育薬> 脳保護薬へのアプローチ—Free Radical Scavenger Edaravone—. (2009年4月11日, 日本大学薬学部)

- 4) 田中正彦. 医薬品評価学特論 臨床開発最前線<臨床試験・承認そして育薬> 脳保護薬へのアプローチ—Free Radical Scavenger Edaravone—. (2011年4月22日, 日本大学薬学部)

- 5) 田中正彦. 医薬品評価学特論 開発の現状・特徴・方向性そして開発事例. (2012年4月10日, 日本大学薬学部)

- 6) 田中正彦. 医薬品評価学特論 田辺三菱の医薬品開発 現状・特徴・方向性そして開発事例. (2013年4月23日, 日本大学薬学部)

- 7) 田中正彦. 医薬品評価学特論 田辺三菱の医薬品開発 現状・特徴・方向性そして開発事例. (2014年4月22日, 日本大学薬学部)

- 8) 田中正彦. 医薬品評価学特論 田辺三菱の医薬品開発 現状・特徴・方向性そして開発事例. (2015年4月28日, 日本大学薬学部)

- 9) 田中正彦. 医薬品評価学特論 田辺三菱の医薬品開発 現状・特徴・方向性そして開発事例. (2016年4月11日, 日本大学薬学部)

摂南大学

- 1) 田中正彦. 薬理学特論 エダラボン/ラジカット 基礎研究から臨床応用.(2009年11月19日, 摂南大学薬学部)

東京工科大学

- 1) 田中正彦. 大学院特別講義 新薬の開発物語 アルガトロバン・エダラボン・アルテプラゼ(rt-PA) <開発の経緯・特徴・評価>.(2014年1月31日, 東京工科大学大学院バイオ・情報メディア研究科)

論文一覧

本論文は以下の報文をもとに構成した。

Tanaka M, Sugimura N, Fujisawa A, Yamamoto Y. Stabilizers of edaravone aqueous solution and their action mechanisms. 1. Sodium bisulfite. *J Clin Biochem Nutr*, in press.

Tanaka M, Motomiya S, Fujisawa A, Yamamoto Y. Stabilizers of edaravone aqueous solution and their action mechanisms. 2. Glutathione. *J Clin Biochem Nutr*, in press.

謝辞

終わりにのぞみ本研究の実施にあたり、たえずご懇切なるご指導とご鞭撻を頂いた山本順寛教授に心より深甚なる感謝の意を表します。

本論文を副査として審査頂き、貴重なご助言と懇切なるご教示を賜りました本学 杉山友康教授、今井伸二郎教授、正木仁教授、加藤輝教授に心から御礼申し上げます。

NMR 分析をお願いした、早稲田大学理工学術院技術部物性計測センターラボ 杉村夏彦氏に深謝致します。

液体クロマトグラフィー質量分析をお願いした、本学 藤沢章雄准教授に深謝致します。

本研究の実験実施にあたり、有益なるご指導、ご助言を頂いた本学大学院修士課程修了(抗加齢医化学研究室)本宮紗月氏に厚く御礼申し上げます。

本論文の完成まで多くの協力を依頼した妻 田中知子に感謝します。

本研究の一部は、公益財団法人天野技術研究所の研究助成金の寄附を受けて行いました。関係者の皆様に感謝致します。