

新規抗悪性腫瘍薬テモゾロミドのカプセル開封後の溶液中での安定性に関する評価

古俵孝明, 水野知行, 田上裕美, 橋田 亨,
矢野育子, 桂 敏也, 乾 賢一*

Evaluation of Stability of Temozolomide in Solutions after Opening the Capsule

Takaaki KODAWARA, Tomoyuki MIZUNO, Hiromi TAUE, Tohru HASHIDA,
Ikuko YANO, Toshiya KATSURA, and Ken-ichi INUI*
*Department of Pharmacy, Kyoto University Hospital, Faculty of Medicine,
Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan*

(Received July 14, 2008; Accepted November 12, 2008)

We evaluated the stability of temozolomide, an alkylating agent, in solutions after opening the capsule. First, we established an analytical method for determination of temozolomide concentration by HPLC. The calibration curve for temozolomide was linear between 0.5–20 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.999$). We then evaluated the stability of temozolomide in each buffer solution (pH 2–9) for 30 min. Temozolomide was decomposed pH-dependently between pH 7 and 9, and completely decomposed at pH 9. Temozolomide in several drinking water samples and beverages was decomposed according to their pH values. We also examined the time-dependent degradation of temozolomide in different pH solutions. Temozolomide started to decompose at 5 min in alkaline and neutral solutions, whereas 90% of temozolomide remained intact in acidic solution at 60 min. These results indicate that the stability of temozolomide after opening the capsule is affected by pH of solvents, and temozolomide is almost stable in acidic solutions.

Key words—temozolomide; stability; glioma; antitumor agent

緒 言

テモゾロミドは初発の膠芽腫症例において、放射線との併用療法により放射線単独療法に比べ生存率の有意な改善を示す新規アルキル化抗腫瘍剤であり、¹⁾ 2006年9月に悪性神経膠腫に対する適応で薬価基準に収載された。テモゾロミドは経口投与後速やかに吸収され、生理的 pH においてメチルトリアゼン誘導体である 5-(3-Methyltriazen-1-yl)imidazole-4-carboxamide (MTIC) に加水分解される。MTIC は活性本体であるメチルジアゾニウムの生成中間体であり、速やかにメチルジアゾニウムイオンと副産物である 5-Amino-imidazole-4-carboxamide (AIC) に分解される。このメチルジアゾニウムイオンが、DNA のグアニン内 6 位の酸素原子をメチル化することにより抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。²⁻³⁾

テモゾロミドはカプセル剤として経口投与される

ため、外来での通院治療が可能である。そのため、現在根治が不可能であると言われている悪性神経膠腫の患者にとっては、従来の点滴治療と比べると拘束期間が短く、QOL の向上が期待できる。一方、テモゾロミドのカプセル開封は曝露による危険性から避けるべきであるとされている。さらに、カプセルを開封した場合、薬物吸収部位に到達する前にテモゾロミドの分解が起こり、力価の低下や口腔、食道内での副作用が発現する危険性が高いことが指摘されている。テモゾロミドは酸性領域では分解されないことが報告されているが、⁴⁾ 実際に酸性飲料水を用いてテモゾロミドの安定性について検討を行った報告はない。また飲料水中に含まれる成分や添加物等のテモゾロミドの分解に対する影響も検討されていない。今後、悪性神経膠腫に対する治療の中心的薬物としてテモゾロミド使用患者数の増加が予想されるが、小児や嚥下障害のある患者では、カプセルのまま服用できないケースがみられることから、テモゾロミドカプセル開封後の安定性に関する基礎情報が必要であると考えられる。

京都大学医学部附属病院薬剤部

*e-mail: inui@kuhp.kyoto-u.ac.jp

そこで本研究では、カプセル開封後のテモゾロミドの安定性について種々飲料水を用いた評価を行い、カプセル開封後も力価が低下しない服用方法について検討を行った。

方 法

1. テモゾロミドの測定法 テモゾロミドの薬物濃度は、既報の文献⁹⁾を基に、HPLC法により測定した。定量はあらかじめ1N塩酸50 μ lを分注しておいた7mlの試験管にサンプル250 μ lを分注し、酢酸エチルを2.5ml加え10分間かく拌した。3000rpmで10分間遠心分離し、有機層のみを分取した。その後、溶媒を窒素気流下45 $^{\circ}$ Cで乾固し、残渣を移動相300 μ lに再溶解後、HPLCに注入した。使用した装置は島津社製品(LC-10ADvpポンプ, SPD-10Avp UV/VIS検出器, CTO-10ACvpカラムオープン, C-R7Aplusクロマトデータ処理装置)で、分析カラムはZORBAX ODS 5 μ m (4.6mm \times 150mm)を用いた。0.1%酢酸-20%メタノール:アセトニトリルが9:1の移動相を作成、1.0ml/minの流速で1サンプル当たり40 μ lを注入した。カラム温度は40 $^{\circ}$ C, UV波長316nmD2ランプを用い、1本当たりの分析時間は10分であった。なお、テモゾロミド溶液は0.1%酢酸-20%メタノールにテモゾロミドの原末(和光純薬工業株)又はカプセル(シェリング・プラウ株)の内容物を溶解して調製し、絶対検量線法により検量線を作成した。

2. リン酸緩衝液中のテモゾロミドの安定性 緩衝液はリン酸二水素ナトリウム・二水和物(NaH₂PO₄·2H₂O)とリン酸(H₃PO₄)、水酸化ナトリウム(NaOH)を用いて、pH=2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9となるよう調製した。テモゾロミドを10 μ g/mlになるように各緩衝液中に添加し、かく拌直後と37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベーションしたのちの検体を採取しテモゾロミドの残存量を測定した。

3. 飲料水のpH測定とテモゾロミド残存率との関係 水道水あるいは代表的な市販飲料水のpHをpH測定器(岩城硝子社製M240pHメーター)にて測定し、緩衝液と同様の検討を行った。テモゾロミドを10 μ g/mlになるように各飲料水中に添加し、かく拌直後と37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベーション後のテモゾロミドの残存量を測定した。なお、こ

れらの飲料水については緩衝能が不明であり、テモゾロミド溶液中に含まれる酢酸によりpHが変動する可能性があるため、飲料水の検討に用いられたテモゾロミド溶液は酢酸を除いた20%メタノールで調製した。また、飲料水中の添加物が測定上の妨害ピークになると考えられるものは、テモゾロミド添加前の飲料水についても同様の処理を行い、添加物による妨害ピークの影響を除きテモゾロミド残存量を測定した。

4. 飲料水中のテモゾロミド残存率の経時的変化 アルカリ性、中性、酸性の各飲料水にテモゾロミドを10 μ g/mlになるように添加し、かく拌直後の検体を採取した。また37 $^{\circ}$ Cでインキュベーションを行い5, 15, 30, 60分後の検体を採取して、経時的なテモゾロミドの残存量を測定した。

5. 統計解析 統計的有意性は、一元配置分散分析ののち、チューキーの多重比較検定で解析した。 $p < 0.01$ を有意と判断した。

結 果

1. テモゾロミドの測定法 テモゾロミドを分離したクロマトグラムをFig. 1に示す。テモゾロミドの保持時間はカプセル製剤、原末ともに約2.4分であった。Figure 2にカプセル製剤と原末から得られた検量線を示す。作成した2つの検量線はともに0.5-20 μ g/mlの範囲で良好な直線性を示した($r = 0.999$, Fig. 2)。

2. 各pH条件下におけるテモゾロミドの安定性 各pH緩衝液へ添加した直後のテモゾロミド量を100%とした場合の添加30分後のテモゾロミド残存率をFig. 3に示す。pH 2-6の緩衝液ではテモゾロミド残存率の有意な低下は認められなかった。一方pH 7-9の緩衝液では、pHの上昇に伴いテモゾロミド残存率の低下が認められた。さらにpH 9の緩衝液からはテモゾロミドは検出されず、すべて分解されていた。

3. 飲料水のpHとテモゾロミド残存率との関係 各種飲料水のpHの測定結果をTable 1に示す。次に、各種飲料水におけるテモゾロミドの安定性とpHとの関係について検討した。Figure 4に示すように、pH 7未満の飲料水ではテモゾロミド残存率の有意な低下は認められなかった。しかし、pH 7以上の飲料水では、pHの上昇に伴いテモゾロミド

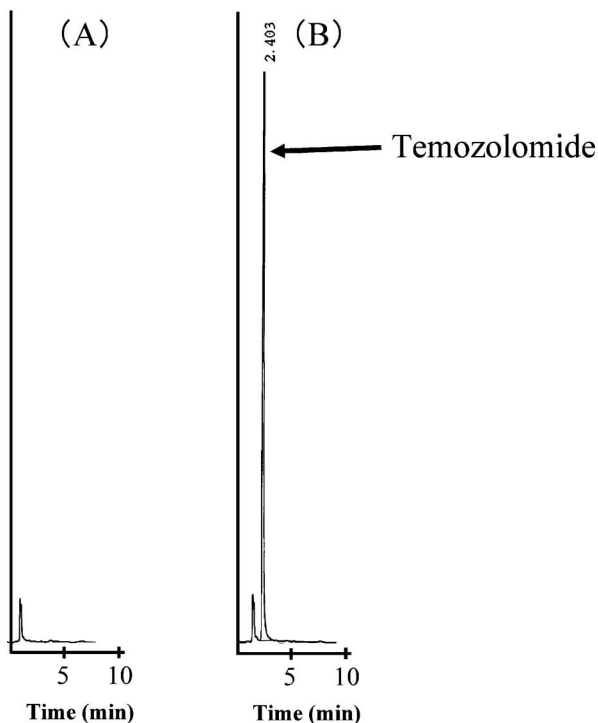


Fig. 1. Typical HPLC Chromatograms of Human Blank Plasma (A) and Human Blank Plasma Spiked with 10 µg/ml Temozolomide (B)

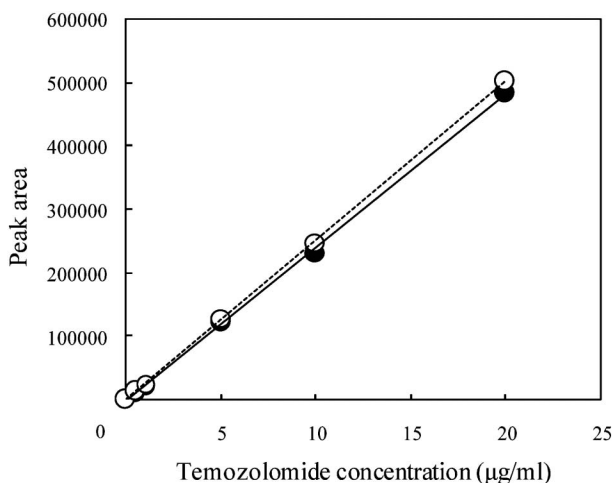


Fig. 2. Relationship between Peak Area and Concentrations of Temozolomide Bulk and Capsule in the HPLC Method (○: capsule, $y = 25042x + 649.29$, $r = 0.999$), (●: bulk, $y = 24090x - 1555.8$, $r = 0.999$).

残存率の低下が認められ、前述した緩衝液中での検討とほぼ同様の結果を示した。

4. 飲料水中でのテモゾロミド残存率の経時的変化
pHの異なる3種類の飲料水にテモゾロミドを添加したのちのテモゾロミド残存率の経時的変化を Fig. 5 に示す。アルカリイオンの水[®]中では添加

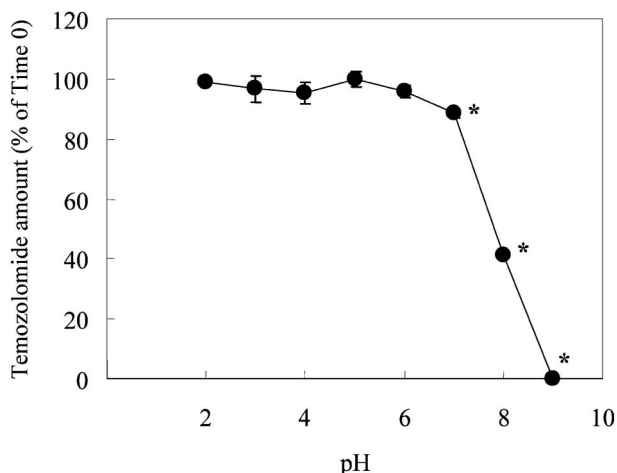


Fig. 3. Stability of Temozolomide after 30 min in Several pH Buffer Solutions

Each point represents the mean ± S.E. of three experiments. * $p < 0.01$, significantly different from pH2 buffer solution.

Table 1. pHs of Several Water and Beverages

Brand name	pH
Carbonated drink: <i>Coca · Cola</i> [®] (Coca-Cola Japan CO., LTD.)	2.57
Soft drink: <i>AQUARIUS</i> [®] (Coca-Cola Japan CO., LTD.)	3.59
Soft drink: <i>POCARI SWEAT</i> [®] (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD)	3.62
Fruit drink: <i>Tropicana 100% juice orange</i> [®] (Kirin Beverage CO., LTD.)	3.84
Fruit drink: <i>Tropicana 100% juice apple</i> [®] (Kirin Beverage CO., LTD.)	3.84
Green tea: <i>NAMACHA</i> [®] (Kirin Beverage CO., LTD.)	5.89
Water	6.68
Milk: <i>OISHII GYUNYU</i> [®] (Meiji Dairies CO., LTD.)	6.71
Lactic drink: <i>GOGONO KOUCHA</i> [®] (Kirin Beverage CO., LTD.)	6.76
Lactic drink: <i>ICHIGO ORE</i> [®] (Meiji Dairies CO., LTD.)	6.86
Natural water: <i>HITA TENRYOUSUI</i> [®] (Hita Tenryousui CO., LTD.)	8.39
Natural water: <i>ARUKARIIONNO MIZU</i> [®] (Kirin Beverage CO., LTD.)	8.95

5分後からテモゾロミド残存率が低下し、30分後にはテモゾロミドは完全に分解していた。水道水中でも時間経過とともにテモゾロミド残存率が低下し、60分で約60%まで低下した。一方ポカリスエット[®]中では添加後にほとんど残存率は変化せず、60分後の残存率も90%以上維持されていた。

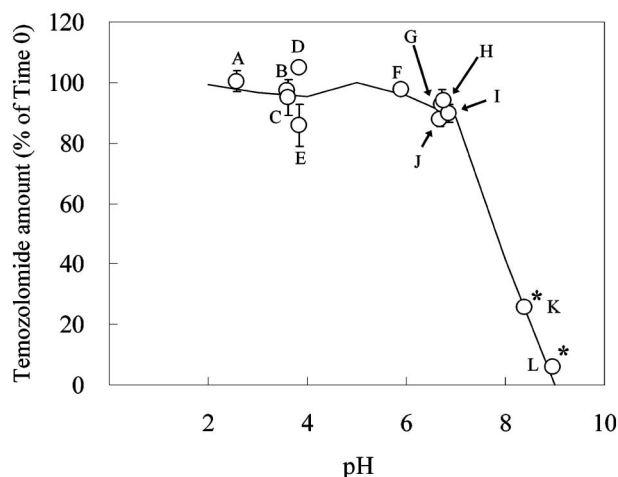


Fig. 4. Stability of Temozolomide after 30 min in Several Water and Beverages

(A: *Coca-Cola*[®], B: *AQUARIUS*[®], C: *POCARI SWEAT*[®], D: *Tropicana 100% juice apple*[®], E: *Tropicana 100% juice orange*[®], F: *NAMA-CHA*[®], G: Water, H: *OISHII GYUNYU*[®], I: *GOGONO KOUCHA*[®], J: *ICHIGO ORE*[®], K: *HITA TENRYOUSUI*[®], L: *ARUKARIIONNO MIZU*[®]) A solid line shows the line in Fig. 3. Each point represents the mean \pm S.E. of three experiments. * $p < 0.01$, significantly different from *Coca-Cola*[®] drinking solution.

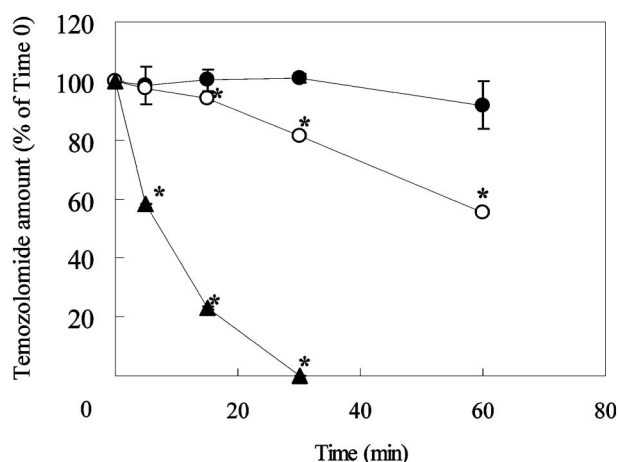


Fig. 5. Time Course of Temozolomide Decomposition in the Typical Three Solutions

(●: *POCARI SWEAT*[®], ○: Water, ▲: *ARUKARIIONNO MIZU*[®]). Each point represents the mean \pm S.E. of three experiments. * $p < 0.01$, significantly different from time 0 of each drinking solution.

考 察

テモゾロミドは悪性神経膠腫に対する新規の抗がん剤としてその効果が期待されているが、カプセル剤であるため意識レベルが低下している患者や乳幼児では、カプセルの大きさが治療上の妨げとなることがある。その場合、治療を行うためにはカプセルを開封して、テモゾロミドを服用せざるをえない。

また、テモゾロミドは抗がん剤であることから、開封者の長期曝露による健康被害のリスクが問題となる。⁶⁾ そのため、抗がん剤のカプセル開封に簡易懸濁法を用いる施設もみられるが、⁷⁾ 小児ではカプセル単位 (20 mg) で投与量を調節することが難しく、必要量を正確に調剤する場合にはカプセルの開封を必要とする場合が多い。したがって、テモゾロミドのカプセル開封後の安定性に関する情報が早急に必要とされる。

テモゾロミドの定量には、既報の文献を基に HPLC によって測定した。その結果、0.5–20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の測定範囲で良好な直線性を示した (Fig. 2)。また、カプセル製剤を溶解して調製した試料溶液でも原末と同様の結果を示したことから、カプセル剤からのテモゾロミドの抽出率はほぼ 100% と考えられ、より実際の服用条件に近いテモゾロミドのカプセル剤を用いて以後の検討を行った。

テモゾロミドは生理的 pH によって加水分解を受け中間代謝物である MTIC に変換される。従って、まず各 pH 条件におけるテモゾロミドの分解率について検討を行った。各 pH 緩衝液を用いて 30 分後のテモゾロミドの安定性について検討したところ、pH 7–9 の条件下では pH の上昇に伴いテモゾロミド残存量が低下した (Fig. 3)。したがって、生体内に限らずテモゾロミドの分解は溶媒の pH に依存することが示唆された。

しかし、飲料水中には様々な成分や添加物が含まれているため、それらがテモゾロミドの安定性に影響を及ぼす可能性も考えられる。そこで、実際に使用される可能性のある市販飲料水を用いて、飲料水中のテモゾロミドの残存率を検討し、緩衝液の結果と比較した。その結果、飲料水を用いた検討においても pH に依存してテモゾロミドが分解され、緩衝液中での検討とほぼ同様の結果を示した (Fig. 4)。したがって、テモゾロミドの分解は飲料水中の pH に依存し、今回検討した品目については添加物の影響はほとんど無視できることが明らかとなった。

実際にカプセルを開封してテモゾロミドを服用する場合、短時間で胃に到達すると考えるならば、水道水を用いても安定性には問題のないことが予想される。しかし、小児では飲料水に懸濁させておいてから服用するケースがあり、懸濁後から服用までに時間を要する場合も考えられる。そこで次に、pH

の異なる3つの飲料水を用いてテモゾロミドの残存率について経時的な変化を確認した。その結果、酸性飲料水では60分後でも高いテモゾロミドの安定性が確認されたが、中性、アルカリ性の飲料水では5分後からテモゾロミドの分解が始まり、時間依存的に分解していた (Fig. 5)。したがって、中性、アルカリ性の飲料水を使用した場合、短時間でもテモゾロミドが分解される可能性があるため、飲料水の選択には酸性飲料水が最も適していることが示唆された。

テモゾロミドは経口剤であるため汎用性が高く、また副作用が少ないという忍容性の点からも、今後の悪性神経膠腫に対する標準的治療になるものと考えられる。再発患者に対しては、テモゾロミドの Metronomic (低用量間歇的持続) 投与方法⁸⁾や、血管新生阻害剤との併用⁹⁾によって臨床例での効果が報告されている。小児に好発する視神経グリオーマでは、5日間のプロトコールで2年間の無増悪生存率は49%、生存率は96%であり、副作用も軽度であるためその有用性が報告されている。¹⁰⁾ 今回の検討結果は、今後のテモゾロミド治療の発展に大いに役立つものと考えられる。

REFERENCES

- 1) Stupp R., Mason W. P., van den Bent M. J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M. J., Belanger K., Brandes A. A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R. C., Ludwin S. K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J. G., Eisenhauer E., Mirimanoff R. O., *N. Engl. J. Med.*, **352**, 987–996 (2005).
- 2) Reyderman L., Statkevich P., Thonoor C. M., Patrick J., Batra V. K., Wirth M., *Xenobiotica*, **34**, 487–500 (2004).
- 3) Baker S. D., Wirth M., Statkevich P., Reidenberg P., Alton K., Sartorius SE., Dugan M., Cutler D., Batra V., Grochow LB., Donehower R. C., Rowinsky E. K., *Clin. Cancer Res.*, **5**, 309–317 (1999).
- 4) Denny B. J., Wheelhouse R. T., Stevens M. F. G., *Biochemistry*, **33**, 9045–9051 (1994).
- 5) Kim H., Likhari P., Parker D., Statkevich P., Marco A., Lin C. C., Nomeir A. A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24**, 461–468 (2001).
- 6) Yodaiken R. E., Bennett D., *Am. J. Hosp. Pharm.*, **43**, 1193–1204 (1986).
- 7) Kitamura Y., Maruo N., Matsuura M., Tatewaki E., Araki H., Shibata K., Kurosaki Y., Kawasaki H., Gomita Y., *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **31**, 755–760 (2005).
- 8) Brandes A. A., Tosoni A., Cavallo G., Bertorelle R., Gioia V., Franceschi E., Biscuola M., Blatt V., Crino L., Ermani M., *Br. J. Cancer*, **95**, 1155–1160 (2006).
- 9) Kirkpatrick J., Desjardins A., Vredenburgh J. J., Quinn J. A., Rich J. N., Sathornsumetee S., Gururangan S., Friedman A. H., Friedman H. S., Reardon D. A., *J. Clin. Oncol.*, **24** (18S), 11522 (2006).
- 10) Gururangan S., Fisher M. J., Allen J. C., Herndon J. E2., Quinn J. A., Reardon D. A., Vredenburgh J. J., Desjardins A., Phillips P. C., Watral M. A., Krauser J. M., Friedman A. H., Friedman H. S., *Neuro-oncol.*, **9**, 161–168 (2007).