

博 士 論 文

調剤業務の臨床疑問に関する分析化学的研究

Analytical chemical studies on clinical questions related to drug compounding

2024 年 3 月

加藤銀次郎

松山大学大学院医療薬学研究科

-目次-

緒論	1
第 1 章 抗がん薬に対する化学的除染剤としてのオゾン水の有効性	4
1-1 実験の部	4
1-1-1 試薬	4
1-1-2 オゾン水の調製	6
1-1-3 空气中オゾン濃度の測定	6
1-1-4 分解実験	6
1-1-5 HPLC 分析	7
1-1-6 ^1H NMR 測定	8
1-1-7 変異原性試験	8
1-1-8 細胞毒性試験	9
1-1-9 統計解析	9
1-2 結果	10
1-2-1 分解実験	11
1-2-2 ^1H NMR による分解混合物の解析	15
1-2-3 毒性試験	19
1-2-3-1 変異原性試験	19
1-2-3-2 細胞毒性試験	22
1-3 考察	24

第 2 章 酸化マグネシウムとの同時簡易懸濁における種々の薬物の化学的安定性 28

第 1 節 酸化マグネシウムとの同時簡易懸濁における脂質異常症治療薬の化学的安定性	29
2-1-1 実験の部	29
2-1-1-1 試薬	29
2-1-1-2 装置	30
2-1-1-3 簡易懸濁液の調製	30
2-1-1-4 簡易懸濁液の処理	31
2-1-1-5 HPLC 分析	31
2-1-1-6 HPLC 分析法のバリデーション	32
2-1-1-7 分解生成物の構造解析	32
2-1-1-8 統計解析	33
2-1-2 結果	34
2-1-2-1 簡易懸濁液の調製	34
2-1-2-2 簡易懸濁液の処理および HPLC 分析	35
2-1-2-3 HPLC 分析法のバリデーション	39
2-1-2-4 分解生成物の構造解析	41
2-1-3 考察	44
第 2 節 酸化マグネシウムとの同時簡易懸濁における抗菌薬の化学的安定性	48
2-2-1 実験の部	48
2-2-1-1 試薬	48
2-2-1-2 装置	49
2-2-1-3 簡易懸濁液の調製	49
2-2-1-4 簡易懸濁液の処理	49
2-2-1-5 HPLC 分析	50

2-2-1-6	HPLC 分析法のバリデーション	50
2-2-1-7	amoxicillin に由来する分解生成物の構造解析	51
2-2-1-8	統計解析	51
2-2-2	結果	52
2-2-2-1	簡易懸濁液の調製	52
2-2-2-2	簡易懸濁液の処理および HPLC 分析	53
2-2-2-3	HPLC 分析法のバリデーション	55
2-2-2-4	amoxicillin に由来する分解生成物の構造解析	57
2-2-3	考察	60
	総括	62
	謝辞	64
	研究成果の掲載紙	65
	引用文献	66
	補足資料	80
	略語一覧	85

緒論

近年、医療が格段に進歩した結果、薬剤師が携わる業務は益々多様化し、複雑化している。そのような状況下、薬剤師は、病棟での活動、服薬管理指導など、患者中心の業務に注力することが求められている。¹⁾ しかしながら、一方では調剤や医薬品の品質管理などの対物業務は依然として重要である。

薬剤師が携わる業務には様々な問題点や課題（臨床疑問）があるが、それらの解決に向けて研究し科学的根拠を蓄積することは、患者の利益につながるだけでなく、薬剤師自身に有益な情報をもたらす。臨床疑問は薬物治療に関連するものが多いが、調剤業務においても解決すべき種々の臨床疑問がある。調剤の対象となる薬物は多種多様であり、その物理化学的性質や危険性を十分に把握したうえで取り扱う必要がある。特に、注射剤の調製、錠剤の粉碎、カプセル剤の開封など、製薬メーカーが提供する薬剤に医療現場において手を加える場合は、品質の低下や薬物の曝露に注意しなければならない。

注射剤の調製に関しては、医療従事者に対する抗がん薬曝露の危険性が以前より指摘されている。^{2,3)} 近年のがん患者の増加にともない、抗がん薬の利用が増加しているが、⁴⁾ 特に細胞障害性抗がん薬は、正常細胞にも作用して遺伝毒性、発がん性、生殖・発生毒性を及ぼす可能性がある。⁵⁻⁷⁾ そのため、長期間にわたり日常的に抗がん薬の注射剤調製作業を行うと、1回あたりの曝露量は微量であっても健康被害が起こる可能性が危惧される。例えば、病院で抗がん薬を扱った薬剤師と看護師にリンパ球の遺伝子異常や染色体異常が検出されたことが報告されている。⁸⁻¹⁰⁾ また、看護師の抗がん薬の曝露と早産や低出生体重児の関連性についても報告がある。^{11,12)}

以上の状況をふまえて、抗がん薬の職業的曝露を最小限にするためのガイドラインが制定され、安全キャビネットや閉鎖式器具の使用、防護服と手袋の着用、および安全キャビネットを含む調剤設備などの除染が推奨されている。¹³⁻¹⁶⁾ これまで、様々な酸化剤、アルコール類または界面活性剤を用いて抗がん薬を拭き取る除染法が報告されている。¹⁷⁻¹⁹⁾ 除染法には化学的分解により薬物を不活化するものと、しないものがあるが、確実に除染して曝露のリスクを最小限にするためには不活化する方法が望ましい。¹⁶⁾ 次亜塩素酸ナトリウム水溶液はその酸化力に基づく分解効果があるため、これまでに報告された除染剤のなかで、抗がん薬に対する除染効果が最も高いことが報告されている。²⁰⁻²⁵⁾ しかしながら、次亜塩素酸ナトリウム水溶液は毒性や残留効果を有し、安全キャビネット等の調剤設備のステンレス部位を劣化させるといった問題がある。そのため、

簡便でより安全な除染剤が求められる。

近年、日本の病院において、安全キャビネット内などで飛散した抗がん薬に対する新たな除染剤として、オゾン水の利用が普及している。オゾン ($E^0 = 2.07 \text{ V}$) は次亜塩素酸ナトリウム ($E^0 = 1.63 \text{ V}$) よりも強力な酸化剤であり、飲料水²⁶⁾ や食品の殺菌、²⁷⁾ 工場や病院の排水浄化²⁸⁾ および手指の消毒²⁹⁾ のために、既に多方面で利用されている。病院で使用されているオゾン水は低濃度であるため、放出されるガス状オゾンは微量である。また、水中に残存したオゾンや放出されたオゾンは自己分解するため残留効果はない。^{30,31)} このように、オゾン水は安全で取扱いが容易であるが、オゾン水による抗がん薬の分解不活化効果に関するエビデンスは極めて不十分である。

一方、錠剤やカプセル剤（以下、固形製剤と呼ぶ）の加工に関しても様々な臨床疑問が存在する。嚥下機能が低下した高齢患者は固形製剤をそのままでは服用できないため、錠剤の粉砕や脱カプセルといった加工を施す必要があるが、さらに経管栄養が必要な患者では、そのような加工を施した薬剤を懸濁液にして投与するのが一般的である。^{32,33)} 嚥下障害は、脳卒中、うつ病、認知症などの疾患でも起こりうるが、加齢変化の1つとして生じるため、超高齢社会における共通の問題である。^{34,35)} 上記のような懸濁液の調製法では、加工後の薬物の化学的安定性や配合変化、薬物の損失、薬物の吸入等による医療従事者の曝露などの問題がある。³⁶⁻³⁸⁾ そこで、これらの問題を解決するために簡易懸濁法が開発された。³⁹⁾ 簡易懸濁法は、固形製剤をそのまま温湯 (55°C) に浸し、室温下で10分間放置し混和することで、製剤を崩壊および懸濁させる方法である。温湯を用いることで懸濁液の調製が容易になり、栄養チューブが詰まるリスクが軽減される。本法は、懸濁のしやすさや栄養チューブの通過性について検証が行われ、大半の固形製剤に適用可能であることが実証されており、³⁹⁻⁴²⁾ 日本の臨床現場で広く用いられている。しかしながら、簡易懸濁条件下における薬物の安定性に懸念があり、³⁹⁾ 特に、複数の医薬品を同時に簡易懸濁した場合の化学的配合変化については、情報が限られている。例えば、酸性または塩基性の薬物と同時に簡易懸濁を行った場合、薬物によっては分解する可能性がある。高齢者の場合、多くの種類の薬物を同時に服用することが多いため、同時簡易懸濁における化学的配合変化についての情報は重要である。

酸化マグネシウム (MgO) は、東アジアにおいて緩下剤として広く使用されており、^{43,44)} 日本では慢性便秘に対して最もよく用いられる薬物である。⁴⁵⁾ 超高齢社会の日本では、慢性的な便秘を訴える高齢患者の増加により、⁴⁶⁾ MgO の使用頻度は益々高くなっている。そのため、便秘を伴う高齢患者が、かぜ症候群などの common disease や

有病率の高い生活習慣病に関連する薬物と同時に MgO を服用する可能性が高い。MgO は水にわずかに溶けて塩基性を示し、また、MgO から生成する Mg²⁺ は錯体やキレート生成する能力がある。⁴⁷⁻⁴⁹⁾ したがって、MgO と同時に簡易懸濁を行った薬物の化学的安定性を評価する必要がある。これまでの研究で、パーキンソン病治療薬であるレボドパは MgO の懸濁液と混合すると分解するため、⁵⁰⁾ それらの同時簡易懸濁は不適切であるとされている。また、抗炎症薬 (aspirin,⁵¹⁾ acetaminophen⁵²⁾、降圧薬 (amlodipine besylate,⁵³⁾ アンジオテンシン変換酵素阻害薬⁵⁴⁾ および抗菌薬 (cefepime⁵²⁾ proxetil⁵²⁾ について、MgO と同時簡易懸濁したときの化学的安定性が検討され、分子内のエステル結合が加水分解を受けて薬効等に影響することが指摘された。他にも使用頻度が高く、エステル結合など塩基に不安定な部分構造を持つ薬物は多く存在するが、それらの化学的安定性については不明である。

著者は、上で述べた臨床疑問を分析化学的見地から捉えて解決することを目的とする研究に着手し、その成果に関連する知見とともに本論文にまとめた。第 1 章では、使用頻度が高い種々の抗がん薬の注射剤を対象とし、薬効成分に対するオゾン水の分解不活化効果に関する研究を行った。第 2 章では、高齢者の服用機会が多い薬物として、脂質異常症治療薬と抗菌薬に焦点をあて、MgO と同時に簡易懸濁した場合の化学的安定性に関する研究を行った。

第1章 抗がん薬に対する化学的除染剤としてのオゾン水の有効性

抗がん薬の除染剤として次亜塩素酸ナトリウム水溶液の有効性はよく知られているが、毒性や残留性の問題があり、使用後に拭き取るかチオ硫酸ナトリウムで処理する必要がある。¹⁸⁾ また、分解生成物の安全性についてはほとんど分かっていない。一方、病院に導入されているオゾン水は、食品の殺菌や手洗いに用いるオゾン水と同程度の濃度であり、²⁹⁾ 放出されるオゾンガスは微量であるため、安全性に問題があるとの報告はみられない。しかしながら、オゾン水の分解効果に関するエビデンスは極めて不十分であり、また、不活化効果に関しては全く検討がなされていない。本章では、代表的な11種類の抗がん薬の製剤(注射剤)を対象に、オゾン水の有効性について検討した。まず、注射剤の一部をオゾン水と混合し、反応液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析することにより、抗がん薬に対するオゾン水の分解効果について検討した。また、分解混合物を¹H核磁気共鳴分光法(NMR)で分析することにより、分解生成物の構造に関して検討を加えた。さらに、注射剤およびその分解混合物の変異原性および細胞毒性を評価して比較することにより、抗がん薬に対するオゾン水の不活化効果について検討した。

1-1 実験の部

1-1-1 試薬

以下に示す抗がん薬の注射剤を用いた。なお、略語を各注射剤の後に示す。Gemcitabine for I.V. infusion 200 mg「Yakult」(GEM, ヤクルト), 5-FU Injection 1000 mg (5-FU, 協和キリン), Pemetrexed Solution for I.V. Infusion 100 mg「NK」(PEM, 日本化薬), CISPLATIN for I.V. infusion 50 mg「MARUKO」(CDDP, 日医工), ELPLAT I.V. INFUSION SOLUTION 100 mg (OXA, ヤクルト), Endoxan[®] for Injection (CP, 塩野義製薬), Ifomide[®] for Injection (IFO, 塩野義製薬), Irinotecan Hydrochloride I.V. Infusion 40 mg「TAIHO」(IRI, 大鵬薬品), Doxorubicin Hydrochloride for Injection 50 mg「NK」(DXR, 日本化薬), Docetaxel I.V. infusion 20 mg/1 mL「EE」(DTX, エーザイ), Paclitaxel I.V. Infusion 100 mg/16.7 mL Hospira (PTX, ファイザー)。GEM, CP, IFO および DXR については、それぞれの添付文書

の記載に従い、注射用生理食塩水で溶解した。さらに、GEM と IFO は 10 倍に、5-FU は 100 倍に蒸留水を用いて希釈した上で使用した。他の製剤に関しては、特に断らない限り希釈せずに用いた。各注射剤に含まれる成分を Table 1 に示す。

Table 1 Composition of formulations

Formulation	Ingredient ^a	Volume (mL) ^b	Concentration (mM)
GEM	<u>gemcitabine</u> hydrochloride 228 mg, D-mannitol 200 mg, anhydrous sodium acetate 12.5 mg, nicotinamide 25 mg, hydrochloric acid, sodium hydroxide	5	152
5-FU	<u>5-fluorouracil</u> 1000 mg, trometamol 1694 mg	20	384
PEM	<u>pemetrexed</u> sodium hemipentahydrate 120.8 mg, D-mannitol 100 mg, L-cysteine hydrochloride hydrate 0.58 mg, L-disodium tartrate hydrate 4 mg, pH regulator	4	58
CDDP	<u>cisplatin</u> 50 mg, sodium chloride, hydrochloric acid	100	1.7
OXA	<u>oxaliplatin</u> 100 mg	20	13
CP	<u>cyclophosphamide</u> monohydrate 106.9 mg	5	77
IFO	<u>ifosfamide</u> 1 g	25	153
IRI	<u>irinotecan</u> hydrochloride hydrate 40 mg, D-sorbitol 90 mg, lactic acid, sodium hydroxide	2	30
DXR	<u>doxorubicin</u> hydrochloride 50 mg, lactose hydrate 500 mg, methyl parahydroxybenzoate 5 mg, pH regulator	10	8.6
DTX	<u>docetaxel</u> 20 mg, polysorbate 80 0.54 g, macrogol 400 0.541 g, anhydrous citric acid	1	25
PTX	<u>paclitaxel</u> 100 mg, anhydrous citric acid 33.4 mg, polyoxyethylene castor oil 8.35 mL, absolute ethanol	16.7	7.0

^aThe medicinal ingredients are underlined.

^bThe values indicate the original volume or the volume after dissolved according to the respective package inserts.

0.5 M リン酸水溶液は関東化学（東京）より、蒸留水（HPLC グレード）、アセトニトリル（HPLC グレード）、リン酸二水素カリウム、ニコチンアミド、シスプラチン、および4-ニトロキノリン1-オキシドは富士フィルム和光純薬（大阪）より、パラオキシ安息香酸メチルは東京化成（東京）より購入した。注射用生理食塩水は大塚製薬（徳島）より購入した。0.05% 3-(トリメチルシリル) プロピオン酸ナトリウム-2,2,3,3-*d*₄ (TSP) 含有重水 (D₂O, atom%D 99.9) は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) より購入した。オゾン試験紙 (Ozone test strips) は Macherey-Nagel (Düren, Germany) より購入した。栄養培地 (Nutrient Broth) は Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA) より購入した。

1-1-2 オゾン水の調製

オゾン水は、ChemO3 COR-120（日科ミクロン、埼玉）を用いて蒸留水の電気分解により調製し、調製後直ちに（10秒以内）用いた。本装置のメーカーが提示するオゾン水濃度は > 4 mg/L であるが、オゾン水の濃度をヨウ素滴定⁵⁵⁾によって測定したところ、異なる3日間で各3回の滴定により、 8.2 ± 0.45 mg/L（平均 ± 標準偏差）の値が得られた。なお、オゾン水の調製、使用および濃度測定はすべて室温下（約 25°C）で実施した。

1-1-3 空气中オゾン濃度の測定

本研究で用いたオゾン水から放出されるオゾンの空气中濃度を評価するために、調製直後のオゾン水 50 mL をビーカーに入れ、液面から約 10 cm の位置で、オゾン試験紙を空気に晒した。試験紙の添付文書に従い、空気に 10 分間晒して変色を観察し、標準変色表と比較した。同じ実験を 3 回行った。

1-1-4 分解実験

微量の注射剤（20-900 μL、薬効成分：約 1.5 μmol）を入れた三角フラスコに、蒸留水（対照試料）またはオゾン水 50 mL を加え緩やかに攪拌して混合した。反応溶液の入った三角フラスコは、遮光するためにアルミホイルで覆い、室温下（約 25°C）で放置した。分解の経時変化を観測するために、混合の直後、30 分後、60 分後および 24 時間後に反応溶液の一部をとり HPLC で分析した。各注射剤について分解実験を 3 回行った。注射剤によっては、完全に抗がん薬を分解するために薬効分量（注射剤の体積）

を減らして実施した。オゾン水処理試料の HPLC ピーク面積を、同じ薬効成分量について蒸留水で処理した対照試料の HPLC ピーク面積と比較した。

1-1-5 HPLC 分析

HPLC 分析には、ポンプ (LC-20AT)、デガッサー (DGU-20A5)、カラムオープン (CTO-10AS vp)、インジェクター (Rheodyne 7725i)、フォトダイオードアレイ検出器 (SPD-M20A) を装備した HPLC システム (島津製作所, 京都) を用いた。CDDP 以外の分解実験では、Waters 社 (Milford, MA, USA) の逆相系 Atlantis T3 カラム (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm) を、ガードカラム (20 × 4.6 mm i.d., 5 μm) を装着して用いた。文献に記載された逆相 HPLC 条件を参考にして、薬物の保持時間が 15 分以内になるように移動相の組成を決定した。CDDP の HPLC 条件に関しては、数種類のカラムを用いて詳細に検討を行い、最終的に Waters 社のイオン交換 Spherisorb SAX カラム (250 × 4.6 mm i.d., 10 μm) を用いた。各注射剤の分解実験における HPLC 装置への注入量は、検体採取時点によらず、以下のとおりであった。GEM, 5-FU, PEM, CDDP, OXA, IRI および DXR, 10 μL; IFO, 20 μL; CP, DTX および PTX, 50 μL。流速は 1.0 mL/min に設定した。また、クロマトグラムの作成には、文献を参考に薬物およびその分解生成物を検出できる波長を選択した。各注射剤の分析における移動相, カラムオープン温度, 波長および参考文献を Table 2 に示す。

Table 2 HPLC conditions^a

Formulation	Mobile phase	Temperature (°C)	Wavelength ^b (nm)	Literature
GEM	0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) / acetonitrile = 93 / 7	25	254	Chen et al., 2015 ⁵⁶⁾
5-FU	water / acetonitrile = 96 / 4	40	200	de Mattos et al., 2013 ⁵⁷⁾
PEM	0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) / acetonitrile = 90 / 10	25	265	Banu et al., 2010 ⁵⁸⁾
CDDP	water = 100	25	209	–
OXA	water / acetonitrile = 90 / 10	25	240	Ficarra et al., 2002 ⁵⁹⁾
CP	water / acetonitrile = 60 / 40	25	205	Hansel et al., 1997 ²²⁾
IFO	water / acetonitrile = 65 / 35	25	200	ibid. ²²⁾
IRI	0.02 M potassium phosphate buffer (pH 3.5) / acetonitrile = 75 / 25	30	225	Murali Balalam et al., 2007 ⁶⁰⁾
DXR	0.02 M sodium phosphate buffer (pH 5.5) / acetonitrile = 65 / 35	40	254	Rodrigues et al, 2009 ⁶¹⁾
DTX	water / acetonitrile = 30 / 70	40	230	Castagne et al., 2011 ⁶²⁾
PTX	water / acetonitrile = 40 / 60	30	230	Yonemoto et al., 2007 ⁶³⁾

^aHPLC analyses were performed modifying the conditions in the literatures indicated.

^bWavelengths used to draw the chromatograms.

1-1-6 ¹H NMR 測定

¹H NMR スペクトルは、ブルカージャパン社（神奈川）の AVANCE 500 NMR 装置（11.75 T）を使用し、300 K にて測定した。1-1-4 に従ってオゾン水で処理した溶液を室温下で 24 時間放置後、ロータリーエバポレーターにより室温にて濃縮乾固した。残渣を 10% 以上の D₂O を含む蒸留水で溶解し、外径 5 mm の NMR 試料管（シゲミ，東京）に入れ、軽水シグナル抑制条件（1D-NOESY）で ¹H NMR を測定した。⁶⁴⁾ 対照として、未処理の注射剤に D₂O を添加した試料を調製し、同じ条件で ¹H NMR スペクトルを測定した。化学シフトの基準物質として TSP (δ 0.0) を用いた。

1-1-7 変異原性試験

各種注射剤およびそれらのオゾン水処理による分解混合物の変異原性試験は、基本的に Ames 試験⁶⁵⁾ に従って実施した。ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の菌

株として TA98 および TA100 を用いた。分解混合物は、オゾン水で処理した注射剤を室温下で 24 時間放置し、ロータリーエバポレーターにより室温にて濃縮乾固して得た。なお、オゾン水処理は、薬効成分（注射剤の体積）とオゾン水の量的関係を変えずに、1-1-4 における操作の反応スケールを大きくして実施した。また、注射剤によっては薬効成分を完全に分解するために、オゾン水の体積に対する薬効成分量の割合を減らして分解混合物を調製した。各種注射剤およびそれらの分解混合物を、蒸留水で 4 段階の濃度の溶液に調製して細菌に添加した。実験結果の提示にあたっては、添加量を薬効成分の質量で表した。分解混合物の添加量は、使用した注射剤中の薬効成分が分解も損失も受けていないと仮定した場合の薬効成分の質量で表した。4-ニトロキノリン 1-オキシド水溶液および蒸留水を、それぞれ陽性対照および陰性対照として用いた。

1-1-8 細胞毒性試験

細胞毒性試験には細胞株としてヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60) およびヒト結腸腺がん細胞 (HCT-116) を American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入し用いた。これらの細胞を各種注射剤およびそれらのオゾン水による分解混合物で処理し、細胞の生存率で細胞毒性を評価した。オゾン水処理は 1-1-7 に従って実施した。HL-60 および HCT-116 の細胞生存率は、それぞれ WST-1 アッセイおよび MTT アッセイを用いて測定した。⁶⁶⁾ 各種注射剤は、凍結乾燥した後、薬効成分の濃度が 10 μM および 100 μM になるように溶液を調製して細胞に添加した。分解混合物は、薬効成分が分解も損失も受けていないと仮定した場合の薬効成分濃度が 10 μM および 100 μM になるように溶液を調製し細胞に添加した。溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。細胞生存率は、試験対象物質を含まない溶媒のみの試料 (対照試料) に対する吸光度の比 (%) で表示した。

1-1-9 統計解析

細胞毒性試験における細胞生存率は、平均 \pm 標準偏差として表した。F 検定で等分散性を確認のうえ t 検定を実施した。p < 0.05 を統計的有意差ありと判定した。

1-2 結果

本研究では、Fig. 1 に示す様々な骨格を持つ抗がん薬の注射剤を検体として用いて、オゾン水の分解不活化効果について検討した。

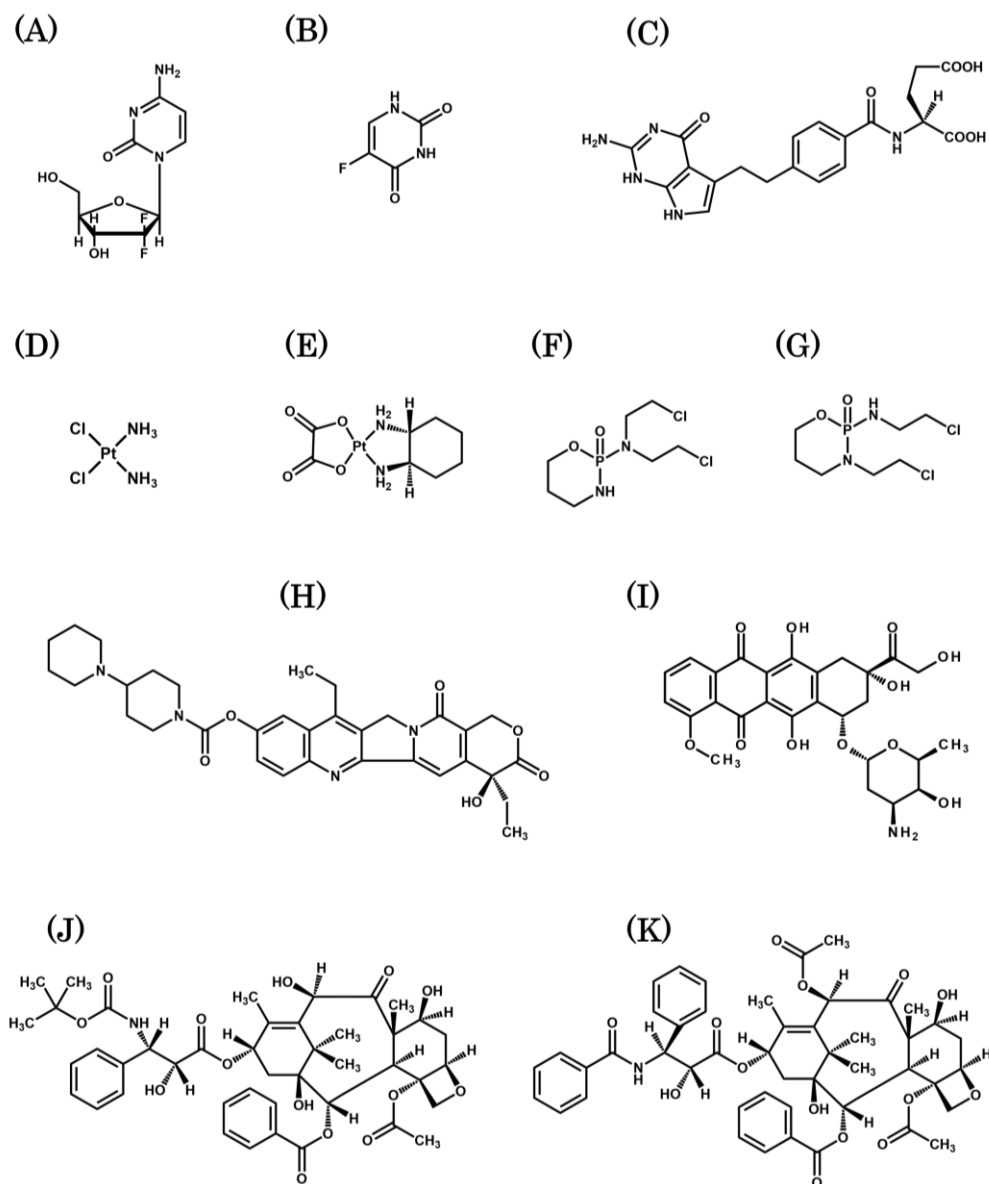


Fig. 1. Chemical structures of antineoplastic drugs examined.

symbols: A, gemcitabine; B, 5-fluorouracil; C, pemetrexed; D, cisplatin; E, oxaliplatin; F, cyclophosphamide; G, ifosfamide; H, irinotecan; I, doxorubicin; J, docetaxel; K, paclitaxel.

1-2-1 分解実験

各注射剤について、HPLC（フォトダイオードアレイ検出器）で分析して得られたクロマトグラムを Figs. 2, 3 に示す。対照試料（蒸留水処理）のクロマトグラム（Fig. 2 のパネル a, d, g, j, m, p, s および Fig. 3 のパネル a, e, h, k）では、GEM と DXR を除いて、単一のピークが観測された。GEM と DXR 以外の注射剤は紫外可視部に吸収を持つ物質を含まないことから、観測されたピークはそれぞれの抗がん薬に起因するものである。GEM と DXR では、主ピークと共に、より強度が小さいピークが観測されたが、それらは標品との保持時間の比較により、それぞれ添加剤として含まれているニコチンアミドおよびパラオキシ安息香酸メチルであることが判明した。したがって、主ピークはそれぞれの抗がん薬に由来することが分かった。また、抗がん薬のピークの紫外可視吸収スペクトルは、それぞれの抗がん薬に特徴的なパターンを示した。Figures 2, 3 に示したピーク以外のピークは他の波長においても観測されなかった。なお、対照試料を HPLC に 3 回注入して得たピーク強度の再現性は良好であり、相対標準偏差は 0.4-5.3%であった。

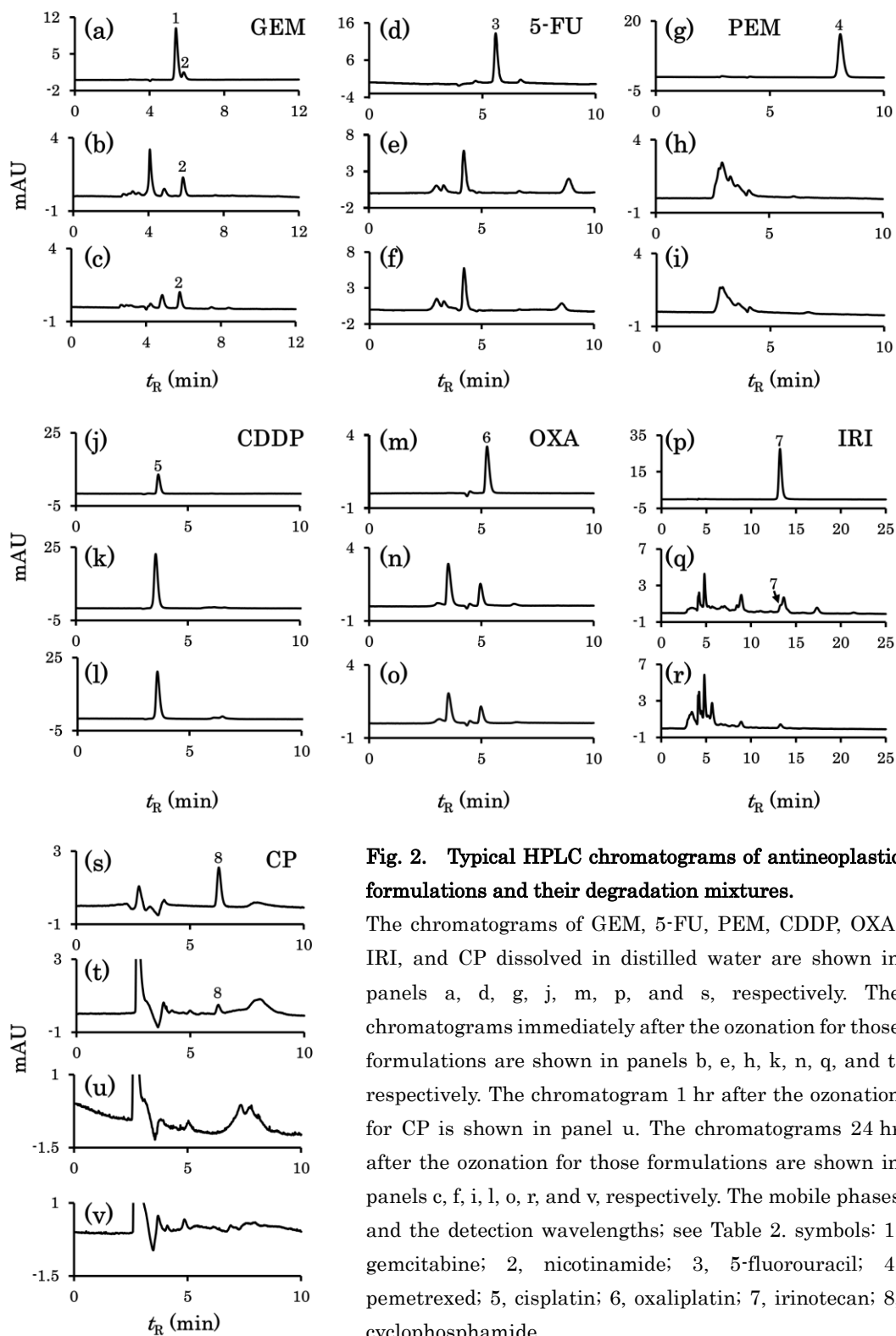


Fig. 2. Typical HPLC chromatograms of antineoplastic formulations and their degradation mixtures.

The chromatograms of GEM, 5-FU, PEM, CDDP, OXA, IRI, and CP dissolved in distilled water are shown in panels a, d, g, j, m, p, and s, respectively. The chromatograms immediately after the ozonation for those formulations are shown in panels b, e, h, k, n, q, and t, respectively. The chromatogram 1 hr after the ozonation for CP is shown in panel u. The chromatograms 24 hr after the ozonation for those formulations are shown in panels c, f, i, l, o, r, and v, respectively. The mobile phases and the detection wavelengths; see Table 2. symbols: 1, gemcitabine; 2, nicotinamide; 3, 5-fluorouracil; 4, pemetrexed; 5, cisplatin; 6, oxaliplatin; 7, irinotecan; 8, cyclophosphamide.

Figure 2 に示すように, gemcitabine, 5-fluorouracil, pemetrexed, cisplatin および oxaliplatin のピークは, オゾン水処理直後に消失したが, cyclophosphamide のピークは完全な消失に 1 時間を要した. また, irinotecan のピークは, 24 時間でほぼ消失した. Doxorubicin および ifosfamide については, 所定の製剤量 (1.5 μmol) ではピーク強度は大幅に減少するものの完全には消失しなかったため, 注射剤の使用体積をそれぞれ 1/3 (薬効成分 0.50 μmol) および 1/2 (薬効成分 0.75 μmol) に減らして実験した. その結果, Fig. 3 に示すように, doxorubicin は直後に, ifosfamide は 1 時間後にピークが消失した. Docetaxel および paclitaxel については分解がほとんど進行しなかったため, 注射剤を蒸留水で大幅に希釈した試料を用い (DTX 600 μL , PTX 20 μL), 薬効成分をそれぞれ 1/100 (15 nmol) および 1/1000 (1.5 nmol) にして実験した. その結果, paclitaxel は 24 時間後にピークが消失したが, docetaxel は 24 時間後でも残存した. なお, 一部の注射剤を除いて, 分解混合物の逆相 HPLC で保持時間の短いピークが多くみられたことから, 分解生成物の大半は薬効成分よりも水溶性が高いことが推測された.

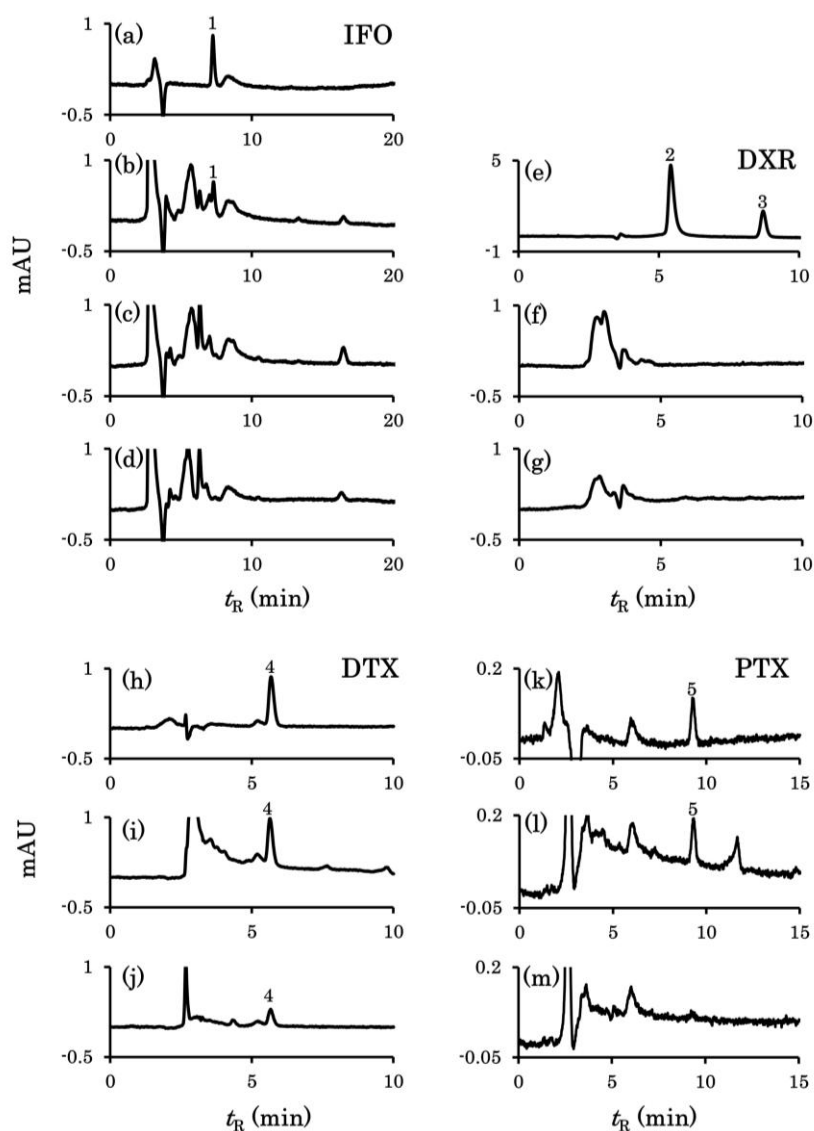


Fig. 3. Typical HPLC chromatograms of antineoplastic formulations and their degradation mixtures.

The chromatograms of IFO, DXR, DTX, and PTX dissolved in distilled water are shown in panels a, e, h, and k, respectively. The chromatograms immediately after the ozonation for those formulations are shown in panels b, f, i, and l, respectively. The chromatogram 1 hr after the ozonation for IFO is shown in panel c. The chromatograms 24 hr after the ozonation for those formulations are shown in panels d, g, j, and m. The chromatograms of IFO, DXR, DTX, and PTX were obtained by reducing the amounts of the medicinal ingredients used for the ozonation to one-half, one-third, one-hundredth, and one-thousandth of the original (ca. 1.5 μmol), respectively. The mobile phases and the detection wavelengths; see Table 2. symbols: 1, ifosfamide; 2, doxorubicin; 3, methyl parahydroxybenzoate; 4, docetaxel; 5, paclitaxel.

1-2-2 ^1H NMR による分解混合物の解析

オゾン水による分解生成物が抗がん活性部位を保持しているかどうかを確認するために、分解混合物を ^1H NMR で分析した (Figs. 4-8). GEM の分解混合物では, Fig. 4 に示すように, gemcitabine のシトシン骨格の二重結合に由来するシグナル (H5, δ 6.09 および H6, δ 7.77) に対応するシグナルは観測されなかった. したがって, gemcitabine の分解生成物は抗がん活性に必要なシトシン骨格を持たないことが示唆された. Matsui ら⁶⁷⁾ はシチジンの水溶液にオゾンガスを導入する実験を行い, シトシン骨格の二重結合 (C5-C6) の開裂を介して環変換が起こり, 4-amino-5-hydroxy-1-ribofuranosyl-2(5*H*)-imidazolone が生じることを報告した. この分解生成物の標品がないため Fig. 4 のパネル II のスペクトルを解析できないが, GEM のオゾン水処理においても, 同じ生成物が生じた可能性がある.

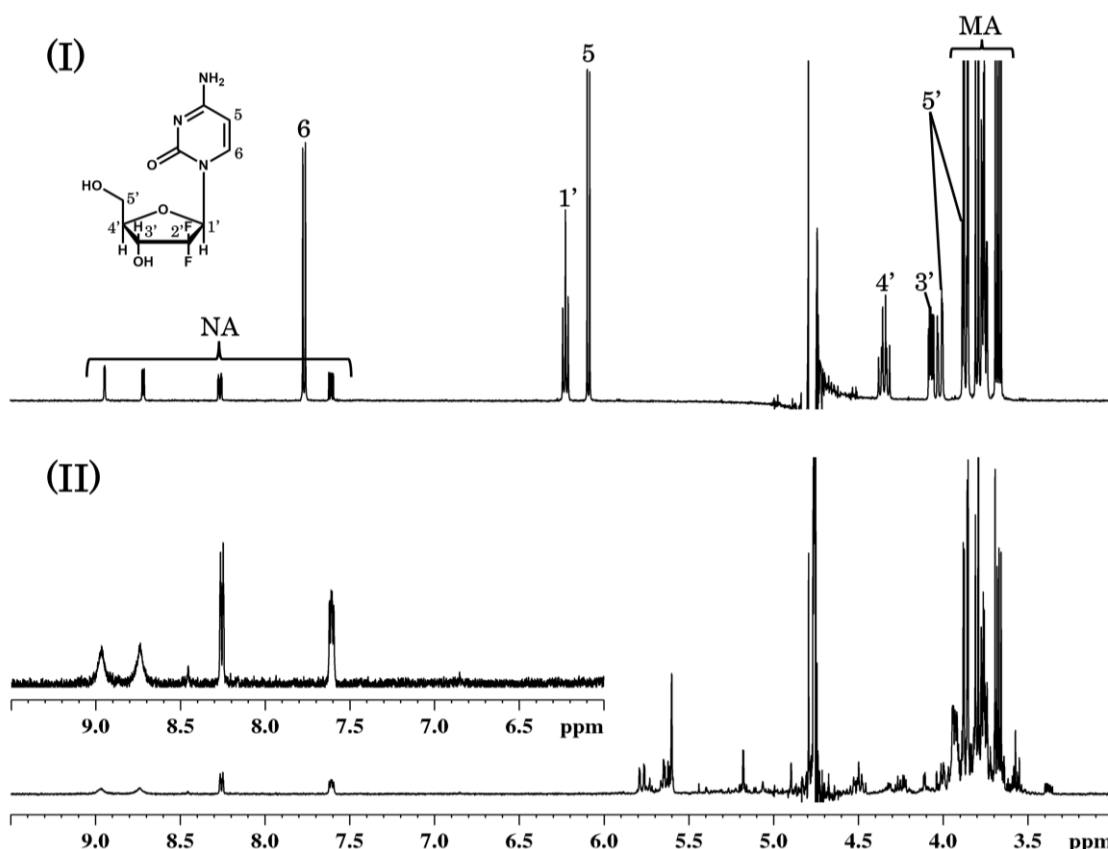


Fig. 4. ^1H NMR spectra of GEM (I) and its degradation mixture after the ozonation (II). The numeric characters on the spectrum (I) show assignments of the signals to the positions of the chemical structure of gemcitabine. The whole spectra were plotted at the fixed height of TSP. symbols: NA, nicotinamide; MA, D-mannitol.

5-FU の分解混合物に関しても、オゾン水処理によって、5-fluorouracil の二重結合に由来するシグナル (H6, δ 7.60) に対応するシグナルは観測されなかったことから、分解生成物は抗がん活性に必要なウラシル骨格を持たないことが示された (Fig. 5). Chen ら⁶⁸⁾ は、5-fluorouracil およびそのプロドラッグである capecitabine の水溶液にオゾンガスをバブリングして一定のオゾン濃度 (4.5 mg/L) に保つことにより、これらの薬物が分解して最終的に *Vibrio Fischeri* に対する毒性を示さない物質に変換されたことを報告した. 本研究における 5-fluorouracil のオゾン水処理においても、同様の生成物が生じた可能性がある.

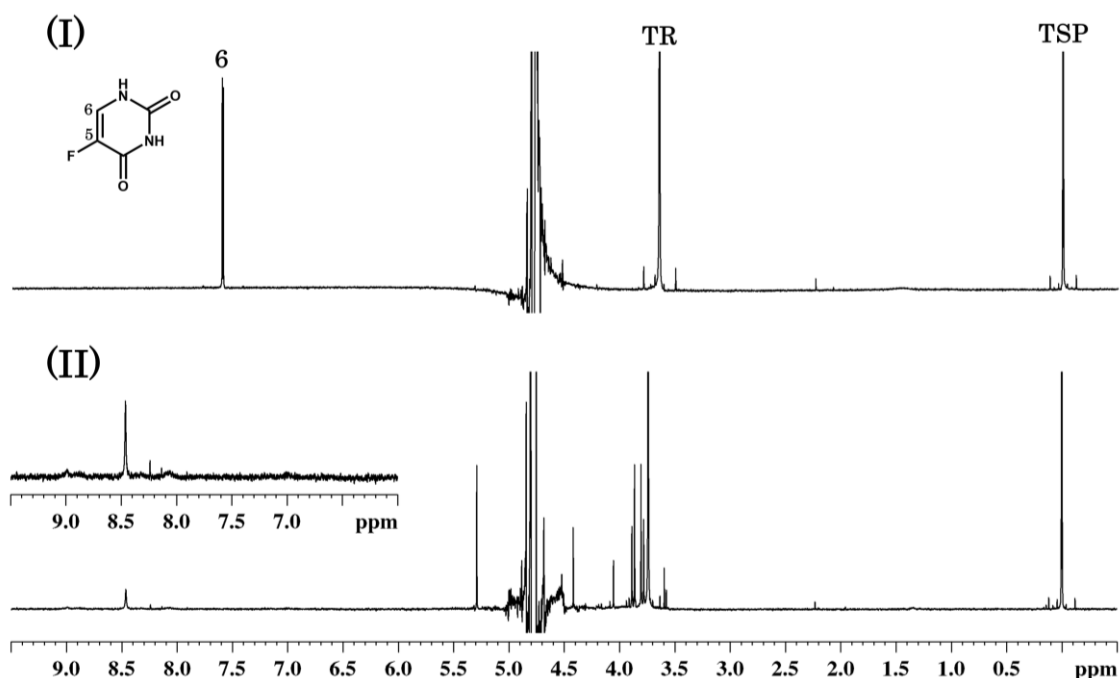


Fig. 5. ^1H NMR spectra of 5-FU (I) and its degradation mixture after the ozonation (II). The numeric character on the spectrum (I) shows assignment of the signal to the position of the chemical structure of 5-fluorouracil. The whole spectra were plotted at the fixed height of TSP. symbol: TR, trometamol.

CP と IFO の分解実験では、薬効成分 (cyclophosphamide と ifosfamide) は完全に分解したにもかかわらず、それらの抗がん活性部位であるクロロエチル基のメチレン基に対応するシグナルが 3-4 ppm に認められた (Figs. 6, 7). Blaney ら⁶⁹⁾ は、病院の排水処理の検討を目的として、オゾンガスをバブリングして調製したオゾン水中における cyclophosphamide および ifosfamide の分解を観察した。その結果、クロロエチル基を持つ 4-ヒドロキシ体および 4-ケト体が生成することが分かった。よって、本研究においても同じ化合物が生じた可能性がある。

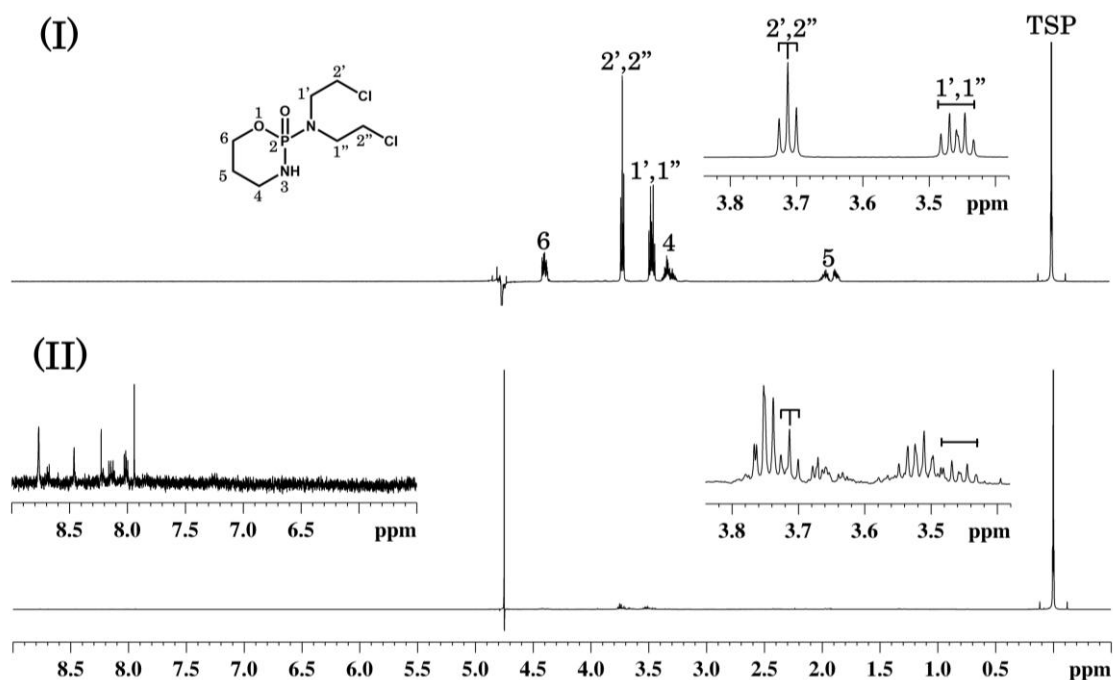


Fig. 6. ^1H NMR spectra of CP (I) and its degradation mixture after the ozonation (II).

The numeric characters on the spectrum (I) show assignments of the signals to the positions of the chemical structure of cyclophosphamide. The whole spectra were plotted at the fixed height of TSP.

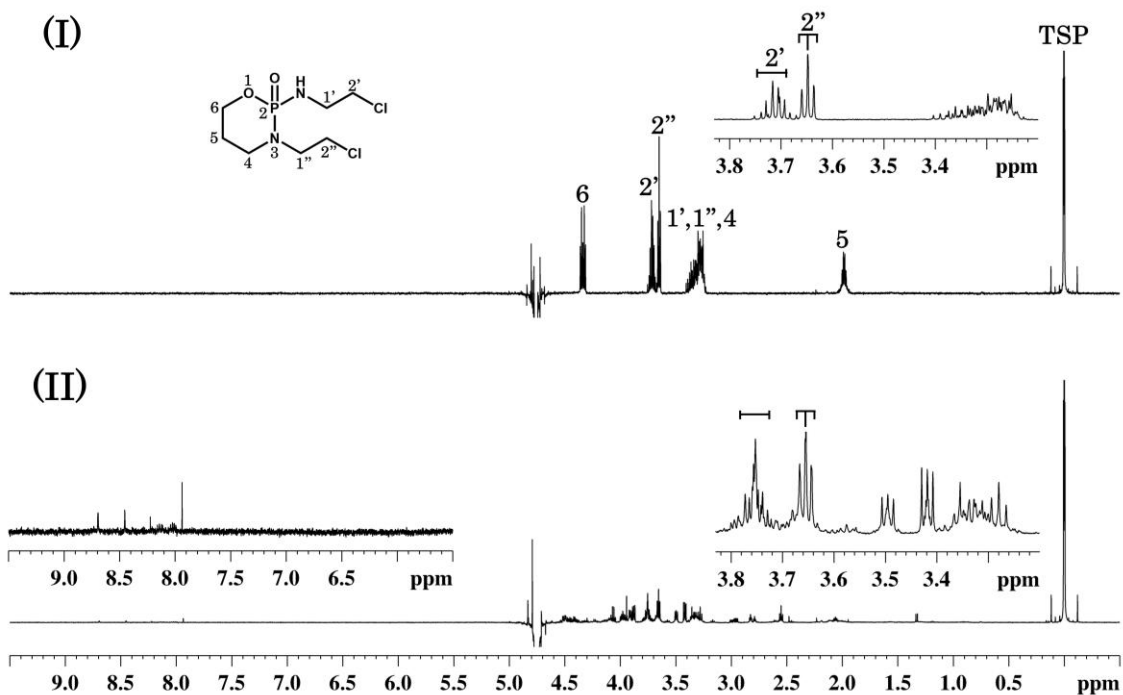


Fig. 7. ^1H NMR spectra of IFO (I) and its degradation mixture after the ozonation (II). The numeric characters on the spectrum (I) show assignments of the signals to the positions of the chemical structure of ifosfamide. The whole spectra were plotted at the fixed height of TSP.

IRI の分解混合物に関しては、Fig. 8 に示すように、irinotecan の二重結合のシグナル (He, δ 7.32) およびメチレンシグナル (Hf, δ 5.46) に対応するシグナルが観測されなかった。したがって、分解生成物は irinotecan の抗がん活性部位である縮合環を持たないことが示唆された。病院からの排水にオゾンガスを導入することによって排水中の irinotecan を分解できるという報告はあるが、分解生成物の構造については言及されていない。⁷⁰⁾

他の注射剤については、分解混合物の ^1H NMR スペクトルが複雑であったことから、分解生成物が抗がん活性部位を保持しているかどうか判断するのが困難であった。

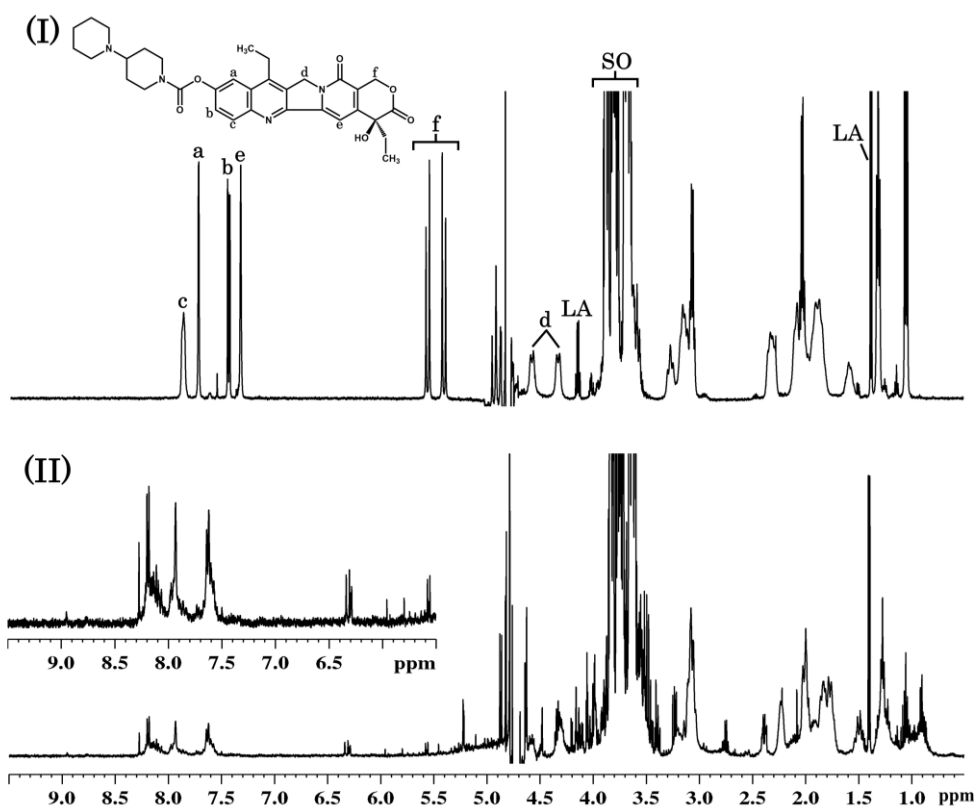


Fig. 8. ¹H NMR spectra of IRI (I) and its degradation mixture after the ozonation (II).

The alphabetical characters on the spectrum (I) show assignments of the signals to the positions of the chemical structure of irinotecan. The whole spectra were plotted at the fixed height of TSP. symbols: LA, lactic acid; SO, D-sorbitol.

1-2-3 毒性試験

1-2-3-1 変異原性試験

各種注射剤およびそれらをオゾン水で処理した分解混合物について Ames 試験を行った結果を Table 3 に示す. 分解混合物中の薬効成分がほぼ完全に分解していることは, HPLC 分析により確認した. 検討した濃度範囲内において, 濃度依存的にコロニーが増加し, 陰性対照の 2 倍以上のコロニーを示した場合を陽性と判定した. 各注射剤の Ames 試験の結果は, それらの薬効成分に対する文献の報告とすべて一致した.⁷¹⁻⁷³⁾ オゾン水処理後の GEM, 5-FU, PEM, OXA, CP および IRI は処理前と同じ陰性のままであったが, IFO に関しては TA98 および TA100 とともに陰性から陽性になった. DXR に関しては, オゾン水処理前は両株ともに陽性であったが, オゾン水処理することで陰性になった. また, CDDP は両株ともに陽性であったが, オゾン水処理により TA100 のみ陰性になった.

Table 3 Number of revertant colonies in the mutagenicity tests^a

Sample	Strain	Amount (µg/plate)				
		0	12.5	25	50	100
GEM	TA98	36 ± 15	31 ± 6	49 ± 11	27 ± 11	19 ± 3
	TA100	184 ± 27	236 ± 18	220 ± 51	282 ± 25	199 ± 6
GEM-de	TA98	36 ± 15	36 ± 10	33 ± 6	35 ± 8	51 ± 5
	TA100	184 ± 27	210 ± 8	253 ± 26	331 ± 41	332 ± 13

Sample	Strain	Amount (µg/plate)				
		0	0.6	1.2	2.4	4.9
5-FU	TA98	47 ± 14	32 ± 9	28 ± 4	15 ± 11	– ^b
	TA100	258 ± 14	262 ± 37	279 ± 21	280 ± 19	440 ± 53
5-FU-de	TA98	47 ± 14	41 ± 13	42 ± 5	39 ± 8	45 ± 3
	TA100	258 ± 14	265 ± 22	238 ± 43	263 ± 13	261 ± 20

Sample	Strain	Amount (µg/plate)				
		0	20	40	80	160
PEM	TA98	56 ± 5	42 ± 16	53 ± 3	50 ± 3	56 ± 5
	TA100	289 ± 94	299 ± 141	272 ± 34	260 ± 72	270 ± 56
PEM-de	TA98	56 ± 5	45 ± 7	52 ± 5	80 ± 44	72 ± 24
	TA100	289 ± 94	262 ± 52	265 ± 30	280 ± 2	272 ± 21

Sample	Strain	Amount (µg/plate)				
		0	0.7	1.4	2.8	5.6
CDDP	TA98	48 ± 12	119 ± 6	190 ± 24	282 ± 9	277 ± 32
	TA100	496 ± 74	817 ± 98	1228 ± 271	1090 ± 28	1111 ± 24
CDDP-de	TA98	48 ± 12	66 ± 23	84 ± 23	106 ± 12	159 ± 19
	TA100	496 ± 74	393 ± 121	455 ± 152	546 ± 106	807 ± 17

Sample	Strain	Amount (µg/plate)				
		0	2.5	5.0	10.0	20.0
OXA	TA98	57 ± 15	70 ± 2	78 ± 6	69 ± 11	58 ± 9
	TA100	397 ± 30	324 ± 41	295 ± 53	216 ± 27	127 ± 10 ^b
OXA-de	TA98	57 ± 15	47 ± 5	61 ± 12	45 ± 4	62 ± 14
	TA100	397 ± 30	342 ± 10	369 ± 16	364 ± 37	331 ± 11

Table 3 *Continued*

Sample	Strain	Amount ($\mu\text{g}/\text{plate}$)				
		0	1.3	2.5	5.0	10
CP	TA98	33 \pm 9	40 \pm 9	45 \pm 9	40 \pm 2	58 \pm 8
	TA100	264 \pm 31	286 \pm 17	284 \pm 50	262 \pm 29	258 \pm 32
CP-de	TA98	38 \pm 4	31 \pm 7	36 \pm 2	40 \pm 4	44 \pm 9
	TA100	264 \pm 31	291 \pm 20	316 \pm 17	321 \pm 20	398 \pm 16
Sample	Strain	Amount ($\mu\text{g}/\text{plate}$)				
		0	6.1	12.3	24.5	49
IFO	TA98	69 \pm 12	78 \pm 26	73 \pm 13	71 \pm 13	73 \pm 26
	TA100	326 \pm 101	262 \pm 91	290 \pm 93	277 \pm 105	277 \pm 115
IFO-de	TA98	69 \pm 12	100 \pm 12	130 \pm 13	195 \pm 19	361 \pm 19
	TA100	326 \pm 101	750 \pm 100	1189 \pm 102	2034 \pm 53	3272 \pm 368
Sample	Strain	Amount ($\mu\text{g}/\text{plate}$)				
		0	2.5	5.0	10.0	20.0
IRI	TA98	39 \pm 6	42 \pm 8	29 \pm 3	41 \pm 8	33 \pm 6
	TA100	213 \pm 27	231 \pm 19	221 \pm 19	276 \pm 7	250 \pm 32
IRI-de	TA98	39 \pm 6	32 \pm 1	37 \pm 2	46 \pm 7	53 \pm 6
	TA100	213 \pm 27	203 \pm 64	231 \pm 55	266 \pm 31	342 \pm 67
Sample	Strain	Amount ($\mu\text{g}/\text{plate}$)				
		0	2.5	5.0	10.0	20.0
DXR	TA98	43 \pm 11	1641 \pm 296	1626 \pm 123	563 \pm 70 ^b	188 \pm 15 ^b
	TA100	300 \pm 24	537 \pm 54	644 \pm 46	415 \pm 50	344 \pm 57 ^b
DXR-de	TA98	43 \pm 11	41 \pm 21	54 \pm 13	41 \pm 8	58 \pm 12
	TA100	300 \pm 24	204 \pm 152	367 \pm 84	335 \pm 93	324 \pm 103

^aTriplicate plates were prepared for the individual samples including the negative controls. The numbers of revertant colonies are shown as mean \pm standard deviation. The abbreviations with -de indicate the degradation mixtures of antineoplastic formulations. The numbers of revertant colonies of positive controls were 290-460 for TA98 and 960-2160 for TA100. The degradation mixtures of CP, IFO, and DXR were prepared under the conditions where the quantity ratios of the medicinal ingredients to ozone water were reduced to one-tenth, one-half, and one-third of the original one, respectively.

^bThe growth of colony was considered to be inhibited owing to the anti-bacterial action.

1-2-3-2 細胞毒性試験

各種注射剤およびそれらをオゾン水で処理した分解混合物の細胞毒性を評価した結果を Fig. 9 に示す。分解混合物中の薬効成分がほぼ完全に分解していることは、HPLC 分析により確認した。5-FU に関して、HL-60 ではオゾン水処理によって細胞生存率の有意な変化はみられなかったが、HCT-116 では細胞生存率が明らかに増加した。GEM, OXA, IRI および DXR では、両細胞において、オゾン水処理により細胞生存率が有意に増加した。一方、PEM, CDDP, CP および IFO では、オゾン水処理により細胞生存率が有意に減少した。

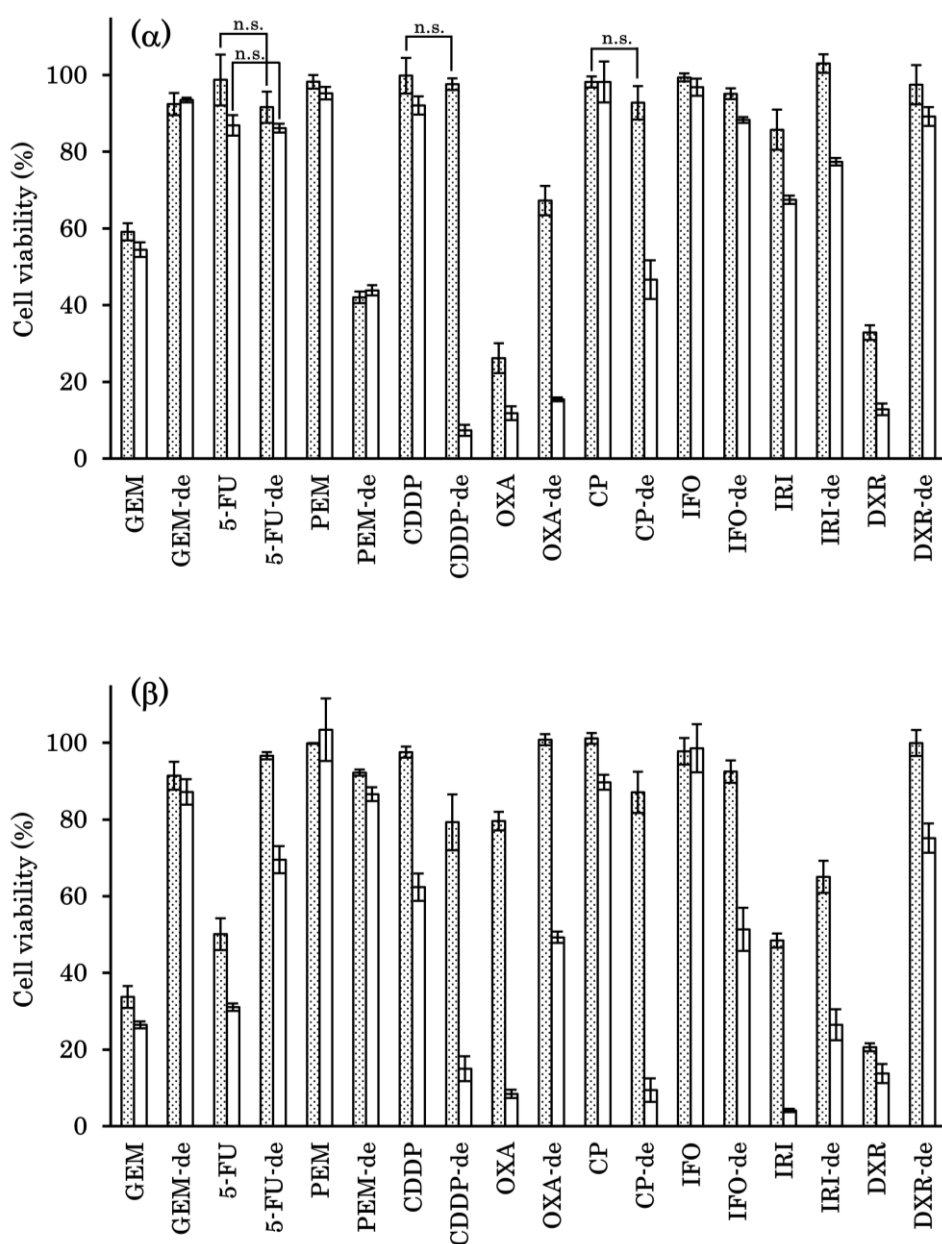


Fig. 9. Cytotoxic effects of antineoplastic formulations and their degradation mixtures against HL-60 (α) and HCT-116 (β).

Cell viability is expressed as a percentage relative to the controls, which contain neither the drugs nor the degradation mixtures. Each bar shows mean \pm standard deviation of three experiments of the same sample. The abbreviations with -de indicate the degradation mixtures. The percentages of each drug were compared with the corresponding degradation mixture at the same concentrations in the individual cell lines. Statistical significance was observed, except for the comparison marked with n.s. (“not significant”). The degradation mixtures of CP, IFO, and DXR were prepared under the conditions where the quantity ratios of the medicinal ingredients to ozone water were reduced to one-tenth, one-half, and one-third of the original one, respectively. stippled bars, 10 μ M; open bars, 100 μ M.

1-3 考察

オゾンによる酸化反応は選択的であり、炭素-炭素多重結合に対する反応性が高いことはよく知られているが、電子密度の高い窒素原子やリン原子、あるいは電子供与基 (-CH₃, -OCH₃) が置換した芳香環に対する反応性も比較的高い。^{28,30} また、オゾン水がガス状オゾンと異なる点は、pH にもよるが、オゾンの一部が水中の水酸化物イオンと反応して分解し、ヒドロキシラジカルを生じることである。ヒドロキシラジカル ($E^0 = 2.80 \text{ V}$) はオゾン ($E^0 = 2.07 \text{ V}$) よりも反応性が高く、非選択的な酸化反応を起こす。³⁰ これらの直接および間接的な反応による抗がん薬の分解が期待される。

本研究で用いたオゾン水生成装置では、水の電気分解⁷⁴により、ボタン1つで十分量のオゾン水を迅速に (1 L/min) 用時調製することができる。オゾン水の調製時において、かすかなオゾン臭は感じられるが、鼻や喉に刺激がない程度であった。これは、0.01 ppm 程度の空気中濃度である。⁷⁵ また、本研究で用いたオゾン水から放出されるオゾンの空気中濃度を試験紙で測定した結果、測定下限値 0.045 ppm (90 µg/m³) 以下であった。労働環境における空気中オゾンの許容濃度 (健康への悪影響がない 8 時間平均曝露濃度の上限) は、米国環境保護庁 (U.S. Environmental Protection Agency) では 0.070 ppm,⁷⁶ 日本産業衛生学会では 0.1 ppm に定められている。⁷⁷ 空気中に放出されたオゾンは速やかに自己分解して酸素になり,⁷⁸ 使用後に水中に残存するオゾンも水酸化物イオンと反応して自己分解する。³⁰ 以上のことから、本装置で生成したオゾン水の取り扱いによる健康への悪影響はみられないと判断される。

本研究では、安全キャビネットなどの調剤設備において飛散する注射剤は多くとも 10 µL であると仮定して実験条件を設定した。例えば、GEM の場合、添付文書に従って溶解した溶液 10 µL 中に 1.5 µmol の gemcitabine が含まれる。そこで、他の注射剤についても GEM に合わせて薬効成分量が約 1.5 µmol になるように調整して実験を行った。除染剤を用いた抗がん薬の拭き取りに関する従来の研究では、そのほとんどにおいて、ステンレス表面に 100 ng - 100 µg の抗がん薬を付着させて実験が行われている。^{18,79-81} 本研究の分解実験で基本的に設定した抗がん薬の使用量 (1.5 µmol) はこれらの拭き取り実験よりも多く、使用量を大幅に減らした DTX および PTX の場合であってもこの範囲に含まれる。本研究では、特に断らない限り、抗がん薬 1.5 µmol に対してオゾン水 50 mL を使用したため、抗がん薬に対するオゾンのモル比は、オゾン水濃度 8.2 mg/L に基づいて約 5.5 であった。

オゾン水は、ピリミジン核を持つ gemcitabine と 5-fluorouracil の分解および不活化

に対して極めて効果が高いことが示された。これらの抗がん薬は、国立病院機構中国四国グループの病院および愛媛大学医学部附属病院を含む愛媛県下の主要病院で最も多く使用される部類に入るため、分解不活化できたことの意義は大きい。シトシン骨格を有する他の抗がん薬、capecitabine, cytarabine, cytarabine ocfosphate および enocitabine についても、同様にオゾン水による分解不活化効果が期待できる。

オゾン水は、白金錯体 oxaliplatin, カンプトテシン誘導体 irinotecan および アントラサイクリン誘導体 doxorubicin の分解不活化に対しても効果的であることが示された。DXR はオゾン水で処理すると、溶液は急速に赤色から無色に変化した。これは、酸化によってアントラサイクリン骨格が変化し、⁸²⁾ 抗がん活性に必要な平面構造が破壊されたものと推察される。同じ骨格を有する epirubicin や daunorubicin に対しても分解不活化効果が期待できる。

葉酸拮抗薬 pemetrexed, 白金錯体 cisplatin, アルキル化剤である cyclophosphamide と ifosfamide はオゾン水によって分解するが、それらの毒性は増加することが判明した。よって、これらの薬物に対してオゾン水処理を適用する場合は注意が必要である。オゾン水は、oxaliplatin に対して不活化効果を示したにもかかわらず、同じ白金錯体である cisplatin に対しては逆に細胞毒性を増加させたことから、他の白金製剤 (carboplatin, nedaplatin, miriplatin) についても、オゾン水の分解不活化効果を検討する必要がある。Cyclophosphamide と ifosfamide については、クロロエチル基を持つ分解生成物が細胞毒性に寄与している可能性がある。

Docetaxel および paclitaxel に関してはオゾン水による分解が極めて困難であった。分解させる薬効成分量を減らすことで分解が起こることは確認できたが、分解混合物の量が少ないため、毒性試験は実施できなかった。DTX と PTX は、溶解補助剤として、それぞれポリソルベート 80 およびポリオキシエチレンヒマシ油 (Fig. 10) を多量に含んでいるが、いずれの物質も分子内に二重結合を有している。したがって、これらの溶解補助剤がオゾン消費したことにより薬効成分の分解が抑制されたものと考えられる。仮にオゾン消費しないような添加剤が使用された場合、docetaxel と paclitaxel は、いずれも分子内に二重結合を持つため、オゾン水によって容易に分解すると考えられる。他の疎水性抗がん薬 etoposide も、注射剤中にポリソルベート 80 を添加剤として含有しているため、オゾン水による分解が困難であることが予想される。

近畿大学のグループは、ステンレス板上に付着させた抗がん薬に対するオゾンガスの分解効果を検討し、cytarabine, 5-fluorouracil, doxorubicin, epirubicin および

daunorubicin が分解することを報告した.^{83,84)} これらの報告は本研究結果と矛盾しないが、分解生成物の毒性についての検討は行っていない。また、オゾンガスは有害であるため、安全キャビネット内など閉鎖系での使用に限定されるのが欠点である。

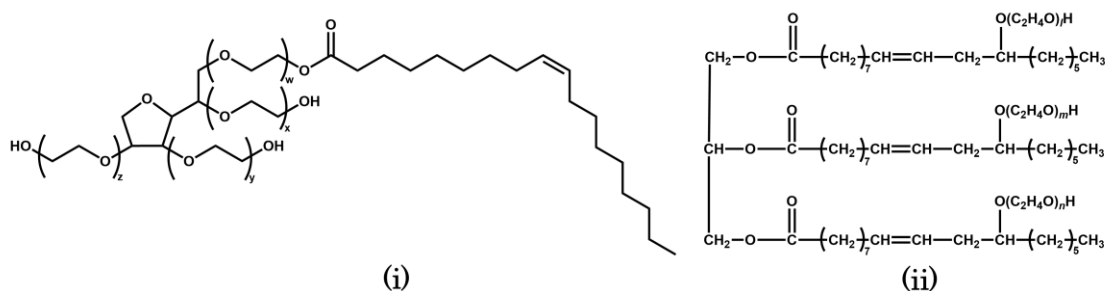


Fig. 10. Chemical structures of polysorbate 80 (i) and polyoxyethylene castor oil (ii).

既に触れたように、病院等の排水中の抗がん薬を除去するためにオゾンガスの利用について研究が行われており、いくつかの抗がん薬は分解することが実証されている。^{68,85)} さらに、オゾンガスによるバブリングと過酸化水素または紫外線を組み合わせた促進酸化処理法についても排水処理方法として検討されている。^{69,86)} これらの方法では、ヒドロキシラジカルが多量に発生するため、オゾンだけではなくヒドロキシラジカルによって抗がん薬を徹底的に分解し、完全に不活化することが期待できる。しかしながら、これらの方法は簡便ではないため、病院環境における除染には適さない。

これまで様々な化学的除染剤が報告されているが、¹⁹⁾ なかでも次亜塩素酸ナトリウム水溶液は最もよく検討された除染剤である。²⁵⁾ この除染剤は、ステンレス部位に対する腐食作用や残留による有害性があるため、使用後にチオ硫酸ナトリウムによる中和が必要であり、簡便性に問題がある。中和するタイミングが早すぎると分解効果の低下につながる欠点もある。²⁴⁾ また、保存中に濃度が低下する恐れがある。本研究で検討した抗がん薬に対する次亜塩素酸ナトリウム水溶液の分解効果を報告した文献を Table 4 に示す。Cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicin は次亜塩素酸ナトリウム水溶液で分解することができ、分解生成物に変異原性がみられないことが報告されている。^{21,22)} この ifosfamide に対する不活化効果は本研究におけるオゾン水の場合と異なっている。なお、doxorubicin については、次亜塩素酸ナトリウム水溶液で処理した際、分解混合物に変異原性がみられるという上記と矛盾する報告もある。⁸⁷⁾ Cisplatin および

paclitaxelの標品についても次亜塩素酸ナトリウム水溶液によって分解すると報告されている。^{23,24)} 一方、次亜塩素酸ナトリウム水溶液による分解生成物の細胞毒性に関する検討結果は、著者の知る限り報告されていない。本研究で検討した pemetrexed や cyclophosphamide のように、変異原性が陰性であっても細胞毒性の増加がみられる場合があることに注意すべきである。このように、次亜塩素酸ナトリウム水溶液の有効性に関するエビデンスはいまだ十分とは言えない。

Table 4 Degradation studies of antineoplastic drugs using sodium hypochlorite.

Literature	Drug (degradation rate, time required)	Concentration of sodium hypochlorite (%)
Hansel et al., 1997 ²²⁾ a	cyclophosphamide (100%, 1 hr), ifosfamide (100%, 3 hr)	5.25
Castegnaro et al., 1997 ²¹⁾ a	doxorubicin (100%, 1 hr)	5.25
Lee et al., 2009 ²³⁾ b	paclitaxel (>99%, 20 min)	0.5
Gohma et al., 2015 ²⁴⁾ b	cisplatin (100%, 4 min), cyclophosphamide (86.6%, 4 min)	2.0

^aFormulation containing the drug was used.

^bAuthentic sample of the drug was used.

本研究により、オゾン水は抗がん薬に対する分解効果を示すが、その効果は抗がん薬の構造および添加剤によって大きく異なること、および抗がん薬の不活化については必ずしも万能ではないことが明らかになった。薬物によっては、オゾン水処理によりむしろ毒性が増加する可能性があることを認識しなければならない。したがって、オゾン水の適用は不活化可能な抗がん薬およびそれらの類縁化合物に限定することが望ましい。

第2章 酸化マグネシウムとの同時簡易懸濁における種々の薬物の化学的安定性

高齢者では、加齢に伴う慢性便秘を訴える患者が多くみられる。^{46,88)} 現在、様々な緩下剤が使用されているが、MgO は最もよく使用される。⁴⁵⁾ 緒論で述べたように、MgO と同時に簡易懸濁した際の薬物の化学的安定性に関していくつかの報告があるが、特に高齢者において使用頻度の高い薬物は他にもあるため、多くのデータの積み重ねが今後の課題である。本研究では、使用頻度が高く、まだ検討例のない薬物として、脂質異常症治療薬と抗菌薬に注目し、それらの代表的な薬物について、MgO との同時簡易懸濁（以下、同時懸濁と呼ぶ）における化学的安定性を検討した。また、先行研究では、試料処理や分析法のバリデーションにおいて不十分な点がみられる。そこで、簡易懸濁液中の薬物を正確に定量するための試料処理法や分析法のバリデーションを重視して研究を行った。第1節では脂質異常症治療薬について、第2節では抗菌薬について検討した結果を論述する。

第1節 酸化マグネシウムとの同時簡易懸濁における脂質異常症治療薬の化学的安定性

心血管疾患は高齢者の主な死因の1つであるが、その危険因子として脂質異常症が挙げられる。^{89,90)} 脂質異常症の治療には、HMG-CoA還元酵素阻害薬（スタチン系薬物）などの脂質異常症治療薬が汎用され高い効果を示している。本節では、脂質異常症治療薬として、代表的なスタチン系薬物および ezetimibe を選び、それらを MgO と同時懸濁した場合の化学的安定性について検討した。

2-1-1 実験の部

2-1-1-1 試薬

脂質異常症治療薬の製剤として、ATORVASTATIN Tablets 5 mg [SAWAI]（沢井製薬）、PRAVASTATIN Na 5 mg（沢井製薬）、ROSUVASTATIN TABLETS 2.5 mg「DSEP」（第一三共エスファ）、Simvastatin Tab. 5 mg “TAKEDA TEVA”（武田テバ）および EZETIMIBE TABLETS 10 mg「DSEP」（第一三共エスファ）を用いた。MgO の製剤として Magmitt[®] Tablets 330（日本新薬）を用いた。以後、これらの製剤を、上記の順にそれぞれ AS, PS, RS, SS, EZ および MG と呼ぶ。また、各製剤の成分を Table 5 に示す。Atorvastatin calcium salt trihydrate（純度：99.8%）、simvastatin（純度：100%）および ezetimibe（純度：96.3%）は東京化成工業（東京）より、pravastatin sodium salt（純度：99.9%）、rosuvastatin calcium salt（純度：99.7%）、蒸留水、アセトニトリル、メタノール、トリフルオロ酢酸（TFA）およびリン酸二水素ナトリウム二水和物は富士フィルム和光純薬（大阪）より、0.5 M リン酸水溶液、クロロホルムおよび 0.03% テトラメチルシラン（TMS）含有重水素化 DMSO（DMSO-*d*₆, atom%D 99.9）は関東化学（東京）より購入した。蒸留水、アセトニトリルおよびメタノールは HPLC グレードであった。弱酸性陽イオン交換樹脂（AMBERLITE[®] IRC76）はオルガノ（東京）より、有機溶媒用メンブレンフィルター DISMIC[®] - 03 JP (0.50 μm) は東洋濾紙（東京）より、0.05% TMS 含有重水素化クロロホルム（CDCl₃, atom%D 99.8）は Eurisotop（Tewksbury, MA, USA）より購入した。

Table 5 Composition of formulations

Formulation	Ingredient ^a
AS	<u>atorvastatin</u> calcium trihydrate 5.42 mg, carnauba wax, sodium croscarmellose, crystalline cellulose, titanium oxide, red ferric oxide, magnesium stearate, talc, calcium carbonate, lactose, hydroxypropyl cellulose, hypromellose, polysorbate 80, macrogol 6000
PS	<u>pravastatin</u> sodium 5 mg, magnesium stearate, lactose, hydroxypropyl cellulose, magnesium aluminometasilicate
RS	<u>rosuvastatin</u> calcium 2.6 mg, lactose monohydrate, cellulose, tribasic calcium phosphate, crospovidone, magnesium stearate, hypromellose, triacetin, titanium oxide, red ferric oxide
SS	<u>simvastatin</u> 5 mg, calcium carbonate, crystalline cellulose, magnesium stearate, lactose monohydrate, hydroxypropyl cellulose, butyl hydroxyanisole
EZ	<u>ezetimibe</u> 10 mg, lactose monohydrate, crystalline cellulose, povidone, sodium croscarmellose, sodium lauryl sulfate, magnesium stearate
MG	<u>magnesium oxide</u> 330 mg, crystalline cellulose, sodium croscarmellose, calcium stearate

^aThe medicinal ingredients are underlined.

2-1-1-2 装置

NMR スペクトルは、第 1 章と同じ装置と試料管を用いて測定した。化学シフトの基準物質として TMS (δ 0.0) を用いた。質量スペクトルは、ブルカー・ジャパン社 (神奈川) の micro TOF-Q 質量分析計 (エレクトロスプレーイオン化) で測定した。HPLC 分析は、第 1 章で用いた装置と逆相系カラムで実施した。pH は、メトラートレド社 (東京) の pH メーター InLab Routine Pro で測定した。遠心分離は、トミー精工の MX301 を用いて 25°C で行った。

2-1-1-3 簡易懸濁液の調製

簡易懸濁液調製の常法^{39,91)}に従い、50 mL のポリプロピレン製遠沈管 (以下、遠沈管) に入れた 55°C の蒸留水 (20 mL) に、脂質異常症治療薬の製剤 (1 錠)、または脂質異常症治療薬の製剤 (1 錠) と MG (1 錠) を浸漬し、遠沈管を 10 分間または 5 時間、室温下 (約 25°C) で放置した。放置の間は、遠沈管全体をアルミホイルで覆い遮

光した。放置後直ちに 30 回の転倒混和と 1 分間のボルテックスミキサーによる攪拌により懸濁液を調製し、Method I または II に従って速やかに処理した（下記参照）。別の実験として、10 分間浸漬後に調製した懸濁液を直ちに遠心分離して、上清を HPLC で分析するとともに、pH を測定した。懸濁液の調製は、いずれの実験においても各製剤について 3 回ずつ行った。

2-1-1-4 簡易懸濁液の処理

簡易懸濁液は下記の方法に従って処理し、得られた溶液を HPLC で分析した。

Method I：遠沈管内の簡易懸濁液全量を 100 mL メスフラスコに移し、遠沈管をメタノール（SS 以外の場合）またはアセトニトリル（SS の場合）を用いて洗い、洗浄液を同じ 100 mL メスフラスコに入れた。各有機溶媒を用いて全量を 100 mL にした後、特に断らない限り超音波で 1 分間処理した。

Method II：SS および EZ に関しては、簡易懸濁液が入った遠沈管を 5 分間遠心分離し（16000×g）、上清 18 mL を弱酸性陽イオン交換樹脂 AMBERLITE® IRC76（約 20 g）を充填したガラスカラム（内径 20 mm）に通した。遠心分離後の残渣に 18 mL のメタノール（EZ の場合）またはアセトニトリル（SS の場合）を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌し遠心分離した。得られた上清を同じ陽イオン交換カラムに通した。完全に薬物を抽出するために、遠心分離後の残渣について同様の操作を再度行った。カラム溶出液を合わせて、それぞれの有機溶媒で全量を 250 mL とした。

2-1-1-5 HPLC 分析

逆相 HPLC の移動相は、Kublin ら⁹²⁾の報告を参考にして設定した（Table 6）。移動相の流速は 1.0 mL/min、カラムオーブンの温度は 25°C に設定した。2-1-1-4 で調製した検体をメタノール（SS 以外の場合）またはアセトニトリル（SS の場合）で希釈し、メンブレンフィルターでろ過後、HPLC に 10 µL を注入した。希釈は、表示量の薬効成分を製剤から完全に回収できた場合に、HPLC に注入する試料が以下の濃度になるように行った：atorvastatin; 2.0 µg/mL, pravastatin; 2.0 µg/mL, rosuvastatin; 1.0 µg/mL, simvastatin; 2.0 µg/mL, ezetimibe; 4.0 µg/mL。クロマトグラムは懸濁液調製後 30 分以内に取得した。ピーク面積に基づき絶対検量線法により濃度を測定した。濃度から懸濁液中に存在する薬効成分の物質量を求め、表示量（物質量）に対する比を算出して回収率（%）とした。

Table 6 Reversed-phase HPLC conditions

Formulation	Composition of mobile phase ^a (buffer / acetonitrile)	Wavelength ^b (nm)
AS	35 / 65	245
PS	60 / 40	234
RS	45 / 55	242
SS	15 / 85	238
EZ	40 / 60	232

^aTwenty millimolar phosphoric acid-sodium dihydrogen phosphate buffer (pH 2.5) was used.

^bWavelengths used to draw the chromatograms.

2-1-1-6 HPLC 分析法のバリデーション

Atorvastatin, pravastatin, rosuvastatin, simvastatin, ezetimibe のメタノール溶液 (約 100 µg/mL) を調製して (純度で補正), 各薬物の標準溶液とし, 適宜希釈してバリデーションに用いた. 検量線は, 2-1-1-5 に示した HPLC 注入時の薬物濃度を中心に, 段階的に 5 種類の濃度の溶液を調製し, それぞれ 3 回ずつ測定したときのピーク面積に基づいて作成した. 日内変動および日間変動は, 検量線の範囲内における 3 種類の濃度 (低濃度, 中濃度, 高濃度) の溶液を調製し, 各溶液について, 異なる 3 日にそれぞれ 5 回測定して求めた. 検出限界 (LOD) および定量限界 (LOQ) は, 様々に希釈した溶液を調製して 5 回ずつ測定し, 信号/雑音比がそれぞれ 3 および 10 になる濃度とした. なお, 雑音はベースラインにおける信号の最大値と最小値の振れ幅とした.

2-1-1-7 分解生成物の構造解析

SS (1錠) と MG (1錠) の同時懸濁液の上清から simvastatin の分解生成物をクロロホルムで抽出し, 室温下でロータリーエバポレーターによって溶媒を留去した. 残渣を CDCl₃ で溶解して ¹H NMR (500 MHz), ¹H-デカップル ¹³C NMR (126 MHz) および 2 次元 NMR である COSY (¹H-¹H correlation spectroscopy) と HMQC (heteronuclear multiple quantum correlation) で分析した. また, SS と MG の同時懸濁液の遠心分離後の上清を HPLC に注入して, 分解生成物を含む溶離液を分取し, 溶離液を濃縮せずに質量分析計に直接注入して質量スペクトル (ポジティブモード) を測定した. 分取の際の HPLC 条件は, 移動相の組成 (0.1% TFA/ アセトニトリル = 15

/85) 以外, 2-1-1-5 と同じであった

EZ (1錠) と MG (1錠) の同時懸濁液を 2-1-1-4 (Method I) に従って処理し, 溶液を濃縮後 HPLC に注入して ezetimibe の分解生成物を含む溶離液を分取した. 分取の際の HPLC 条件は, 移動相の組成 (0.1% TFA/ アセトニトリル = 40/60) 以外, 2-1-1-5 と同じであった. 分取した溶液をロータリーエバポレーターを用いて室温下で濃縮乾固した後, 残渣を DMSO- d_6 で溶解して, SS 分解生成物の場合と同様の NMR 分析を行った. また, 分解生成物を含む溶離液を濃縮乾固し, 残渣をアセトニトリルで溶解して質量分析を行った.

Simvastatin および ezetimibe の標品においても同じ条件で各種スペクトルを測定し, 分解生成物のスペクトルと比較した.

2-1-1-8 統計解析

錠剤からの薬効成分の回収率は, 平均 \pm 標準偏差として表した. 一元配置分散分析後, Tukey's test の多重比較検定を実施し, $p < 0.05$ を統計的有意差ありと判定した.

2-1-2 結果

2-1-2-1 簡易懸濁液の調製

本研究で対象とした脂質異常症治療薬は、Fig. 11 に示すように、エステル、 δ -ラクトン、 β -ラクタムといった塩基性条件下で安定性が懸念される部分構造や、カルボキシ基など配位基となりうる構造を持つ。

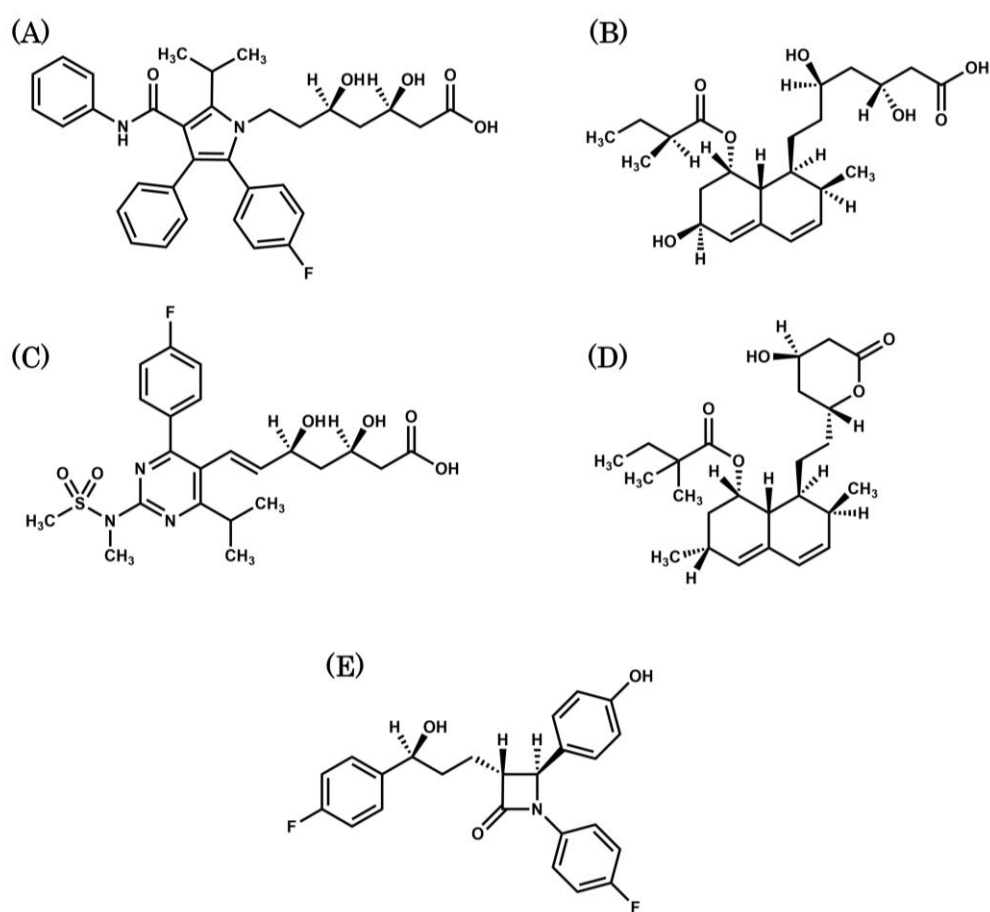


Fig. 11. Chemical structures of antidyplipidemic drugs examined.

symbols: A, atorvastatin; B, pravastatin; C, rosuvastatin; D, simvastatin; E, ezetimibe.

これらの脂質異常症治療薬の錠剤は単剤での懸濁でも MG との同時懸濁においても 10 分間で崩壊し、懸濁液を調製することができた。懸濁液を遠心分離して得た上清の pH を測定したところ、脂質異常症治療薬の錠剤単独では AS 以外ほぼ中性領域であったが MG との同時懸濁液ではすべての場合で弱塩基性を示した (Table 7)。

Table 7 pH values of supernatants of the simple suspensions prepared after soak for 10 min^a

Formulation	pH	
	without MG	with MG
AS	9.5 ± 0.14	10.7 ± 0.04
PS	7.0 ± 0.21	10.8 ± 0.01
RS	6.5 ± 0.09	10.8 ± 0.06
SS	6.9 ± 0.24	10.7 ± 0.08
EZ	7.7 ± 0.41	10.8 ± 0.04

^aEach formulation (one tablet) was subjected three times to the simple suspension method with or without MG (one tablet). The values are shown as mean ± standard deviation. When only MG (one tablet) was subjected three times to the simple suspension method, the pH value of the supernatant was 10.7 ± 0.10.

2-1-2-2 簡易懸濁液の処理および HPLC 分析

簡易懸濁液の分析において、錠剤から薬効成分を定量的に回収するために試行錯誤を繰り返した結果、Method I のように、簡易懸濁液の全量を多量の溶媒で希釈して抽出する方法が適していることが分かった。その際、メスフラスコ内に沈殿物が存在したが、その体積は、使用した錠剤の体積から判断して 0.5 mL 以下であるため、溶液の体積への影響は無視できる程度であった。

HPLC 分析を行った結果、AS、PS および RS では、単剤での懸濁および MG との同時懸濁ともに、それぞれ薬効成分のピークのみ観測され、分解生成物のピークはどの波長においても観測されなかった (Fig. 12)。

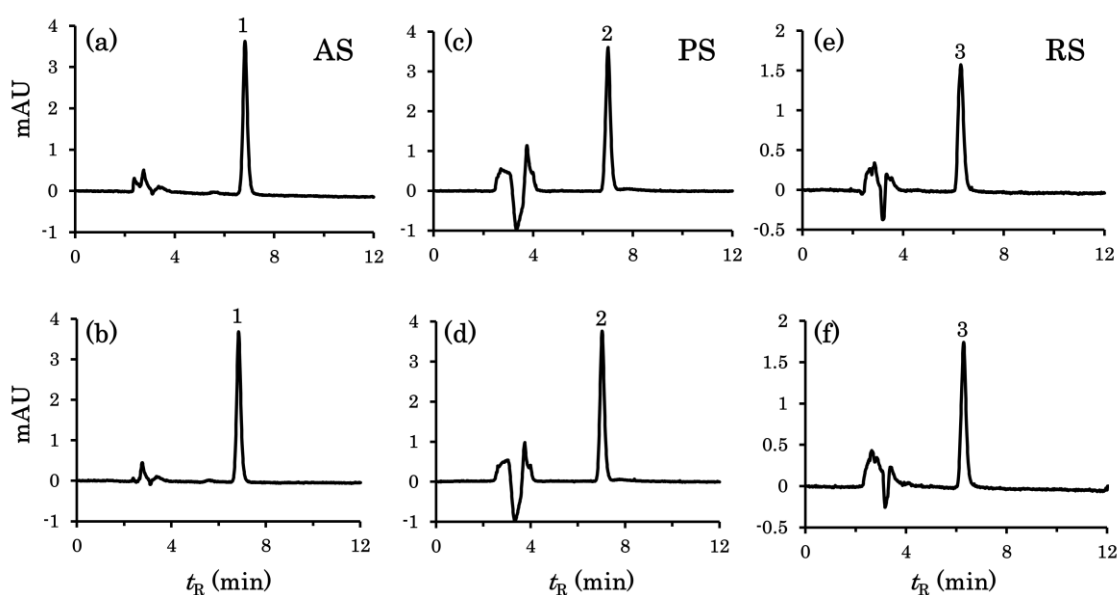


Fig. 12. HPLC chromatograms of AS (left), PS (middle), and RS (right) suspended with or without MG under the condition of simple suspension method.

The suspensions of the following formulations were prepared and treated by method I, and the resulting solutions were analyzed by HPLC. a: AS; b: AS+MG; c: PS; d: PS+MG; e: RS; f: RS+MG. This figure shows the chromatograms obtained from the suspensions after 10 min soakage. The mobile phases and detection wavelengths; see Table 6. symbols: 1, atorvastatin; 2, pravastatin; 3, rosuvastatin.

SSに関しては、単剤での簡易懸濁液では薬効成分のピーク (t_R 8.4 min) と無視できる程度の分解生成物のピーク (t_R 6.4 min) が観測され、MG と同時懸濁した際は分解生成物のピークが顕著になった (Fig. 13 のパネル a, b, c). 分解生成物は、保持時間が simvastatin より短いことから、エステルや δ -ラクトン部が加水分解されて生成した極性がより高い物質であると推察された. EZ に関しては、単剤での簡易懸濁液を分析した際は薬効成分のピークのみ観測されたが、MG と同時懸濁すると、 t_R 10.6 min に微小な分解生成物のピークが認められた (Fig. 13 のパネル e, f, g). この分解生成物は、その保持時間から、ezetimibe より極性の低い化合物であると推察された. また、分解生成物ピークの吸収スペクトルを確認したところ、simvastatin と分解生成物の吸収スペクトルは酷似していたことから、分解によって発色団はほぼ変化してないことが示唆された (Fig. 14).

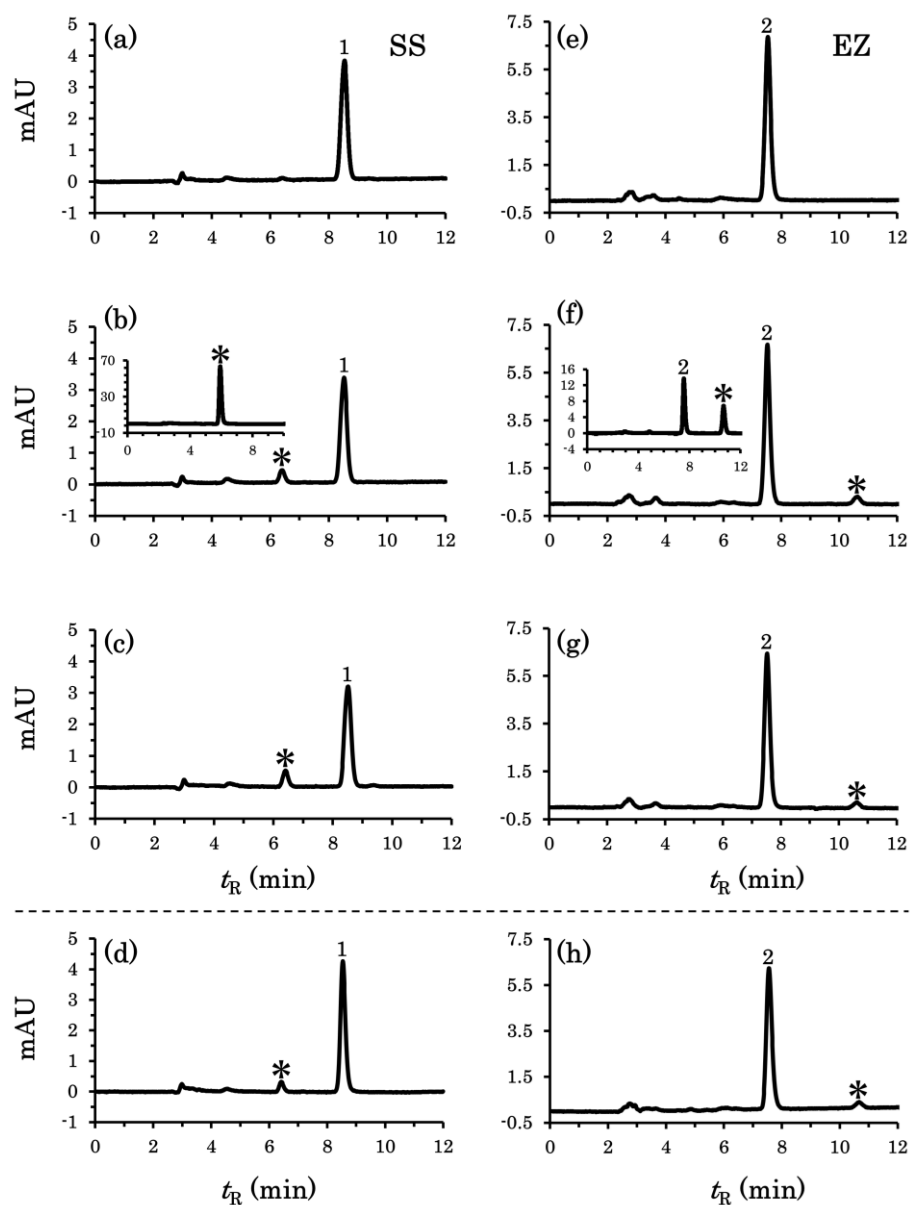


Fig. 13. HPLC chromatograms of SS (left) and EZ (right) suspended with or without MG under the condition of simple suspension method.

The suspensions of the following formulations were prepared and treated by method I (a, b, c, e, f, g) or method II (d, h), and the resulting solutions were analyzed by HPLC. a: SS; b, c, and d: SS+MG; e: EZ; f, g, and h: EZ+MG. a, b, d, e, f, and h: 10 min soakage; c and g: five hr soakage. The insets in panels b and f show the chromatograms of the aqueous supernatants immediately after the preparation of co-suspension (10 min soakage). The mobile phases and wavelengths; see Table 6. symbols: 1, simvastatin; 2, ezetimibe; *, degradation product.

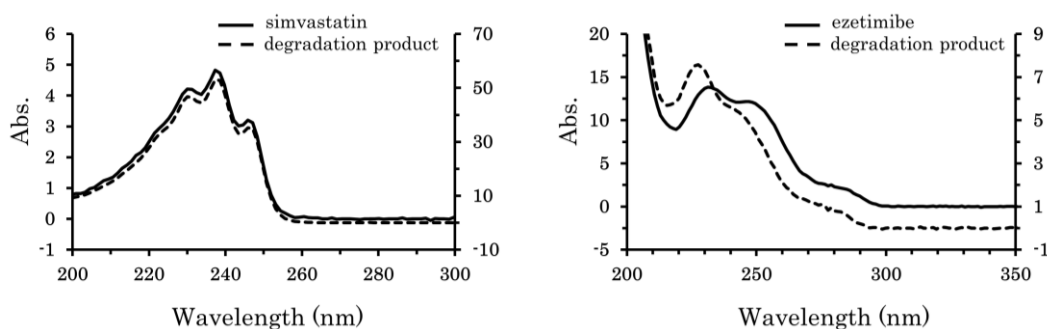


Fig. 14. Absorption spectra of simvastatin and its degradation product (left), and ezetimibe and its degradation product (right).

The left and right vertical axes of each panel indicate the absorbance of the drug and its degradation product, respectively.

Method I では、中和せずに試料処理を行ったため、SS および EZ に関しては、処理中に分解が進行した可能性が否定できない。そこで、同時懸濁液の上清や抽出液を中和する方法について検討した。まず、塩酸を懸濁液に直接添加して中和を試みたが、pH を中性領域に調整するのは極めて困難であった。そこで、懸濁液上清と抽出液を、弱酸性陽イオン交換樹脂 AMBERLITE を充填したカラムに通すことにより中和してから HPLC で分析する方法を考案した (Method II)。MgO の使用量 (330 mg) と AMBERLITE のイオン交換量 ($\gg 3.9 \text{ mEq/g}$) から、中和に必要な AMBERLITE の最小量は約 2.0 g であったが、念のため、その約 10 倍量をカラムに充填して用いた。MG との同時懸濁液の上清をこのカラムで処理した場合、溶離液の pH は、pH 試験紙を用いて中性領域 (pH 6-7) であることを確認した。この方法で得られた HPLC クロマトグラム (Fig. 13 のパネル d, h) では、SS および EZ の両方において、分解生成物のピークは Method I の場合と同程度の強度で観測された。したがって、分解は処理中よりも MgO との同時懸濁時に起こることが分かった。また、Fig. 13 のパネル b, f の副図に示すように、MgO との同時懸濁液 (10 分間浸漬) の上清を前処理せずにそのまま (懸濁液調製後直ちに) HPLC で分析しても分解物のピークが観測されたことから、分解は MG との同時懸濁により起こることがより明確になった。

HPLC のピーク面積を基に簡易懸濁液中の薬物量を測定し、回収率を算出した (Table 8). 単剤での簡易懸濁 (浸漬 10 分後) の回収率は 98-105% であり, すべての薬物において浸漬 5 時間後に有意な変化は認められなかった. MG との同時懸濁では, atorvastatin および pravastatin の回収率は単剤の場合と比較して有意な差はみられなかったが, rosuvastatin に関しては浸漬 5 時間後において回収率が大きく減少した.

Table 8 Quantitative determination of the medicinal ingredients in the simple suspensions^a

Formulation	without MG (%)		with MG (%)	
	after 10 min	after five hr	after 10 min	after five hr
AS	99.9 ± 3.2	94.2 ± 0.9	96.3 ± 2.2	91.7 ± 4.6
PS	100.5 ± 2.7	101.9 ± 3.4	96.4 ± 3.1	94.3 ± 3.4
RS ^b	97.6 ± 1.4	92.8 ± 1.9	95.3 ± 0.7	68.9 ± 6.8 [†]
SS	98.2 ± 0.9	96.4 ± 0.3	88.2 ± 1.0 [*]	86.4 ± 2.1 [†]
	(98.4 ± 1.9)	(97.7 ± 1.6)	(88.3 ± 2.1) [*]	(88.8 ± 2.5) [†]
EZ	104.7 ± 1.7	103.9 ± 2.3	98.6 ± 2.0 [*]	99.9 ± 1.5
	(100.6 ± 1.0)	(99.6 ± 0.8)	(98.2 ± 2.3)	(92.9 ± 2.6) [†]

^aThe tablets were soaked into the warm water, suspended and treated by method I. The percentages of the quantitative values to the labeled amounts of the individual tablets were calculated. For SS and EZ, the suspensions were also treated by method II, and the quantitative results are shown in the parentheses. The values are shown as mean ± standard deviation of three experiments.

^bThe mixtures in the 100-mL volumetric flasks were sonicated for 10 minutes.

^{*} $p < 0.05$ vs. after 10 min without MG.

[†] $p < 0.05$ vs. after five hr without MG.

2-1-2-3 HPLC 分析法のバリデーション

各薬物の日内変動および日間変動の相対標準偏差は, それぞれ 1.9% 以下および 2.4% 以下であった (Table 9). また, 検量線は良好な直線性 ($r^2 > 0.999$) を示し, LOD および LOQ は, それぞれ 16-65 ng/mL および 47-262 ng/mL であった (Table 10). これらのバリデーションの結果は, 本研究の目的を果たすうえで許容範囲内であった.

Table 9 Intra- and inter-day precision^a

Drug	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day				Inter-day			
		Mean ($\mu\text{g/mL}$)	Standard deviation	Relative standard deviation (%)	Bias ^b (%)	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	Standard deviation	Relative standard deviation (%)	Bias ^b (%)
atorvastatin	0.50	0.50	0.006	1.1	1.9	0.51	0.006	1.2	2.9
	1.00	0.97	0.012	1.2	-3.1	0.97	0.006	0.6	-2.4
	2.99	2.99	0.051	1.7	-0.22	2.99	0.024	0.8	-0.23
pravastatin	0.47	0.49	0.006	1.3	2.9	0.48	0.008	1.6	1.7
	0.95	0.98	0.009	0.9	3.7	0.98	0.005	0.5	3.2
	2.85	2.98	0.028	0.9	4.5	2.97	0.048	1.6	4.3
rosuvastatin	0.30	0.31	0.006	1.9	3.9	0.31	0.005	1.6	2.8
	0.50	0.51	0.006	1.2	1.8	0.51	0.012	2.4	2.1
	1.50	1.44	0.021	1.5	-3.9	1.45	0.034	2.4	-2.9
simvastatin	0.30	0.30	0.005	1.7	1.4	0.30	0.007	2.3	-0.76
	1.00	0.99	0.005	0.5	-1.5	0.97	0.018	1.9	-3.5
	3.00	2.85	0.008	0.3	-2.6	2.87	0.039	1.4	-4.1
ezetimibe	0.96	0.92	0.002	0.2	-4.0	0.92	0.006	0.7	-4.2
	1.93	1.87	0.024	1.3	-2.9	1.87	0.002	0.1	-2.8
	5.76	5.70	0.031	0.5	-1.1	5.69	0.005	0.1	-1.2

^aThe quality control samples were analyzed five times using the HPLC system for the intra-day precision, and such experiments were performed on three different days for the inter-day precision.

^bThe differences between the sample concentrations and the measured ones.

Table 10 Calibration curves, LOD, and LOQ

Drug	Slope	Intercept	r^2	Concentration range ($\mu\text{g/mL}$)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
atorvastatin	24071	-710.08	0.9998	0.25-3.96	16	47
pravastatin	25765	+517.02	0.9998	0.31-4.18	65	262
rosuvastatin	23669	+584.67	0.9999	0.24-1.95	49	210
simvastatin	29927	-8.2361	0.9999	0.24-3.92	37	157
ezetimibe	22969	-1890.3	0.9996	0.52-8.33	36	143

2-1-2-4 分解生成物の構造解析

SS と MG の同時懸濁液をクロロホルムで抽出し、抽出物を HPLC で分析したところ、目的の分解生成物を選択的に抽出できたことが分かった。Simvastatin およびクロロホルム抽出物の ^1H NMR スペクトルを Fig. 15 に示す。クロロホルム抽出物 (Fig. 15 のパネル II) では、分解生成物に由来する主要なシグナルが、simvastatin の微小シグナルや製剤添加物のシグナルとともに観測された。また、分解生成物では、simvastatin のラクトン部の H2 および H5 に対応するシグナルの高磁場シフトが観測された。一方、HPLC で分取した分解生成物の精密質量を測定したところ、 m/z 459.2737 に明瞭なピーク (Na^+ 付加体) が観測されたことから、分解生成物の分子式は $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{O}_6$ であり、分子量 (436) は simvastatin より 18 (水分子) だけ大きいことが分かった。以上のデータは、simvastatin のエステル結合ではなくラクトン部が加水分解を受けたことを示唆する。Simvastatin の標品は、Table 11 に示す塩基性条件下において、ラクトン部が加水分解を受けてヒドロキシ体 (simvastatin acid, Fig. 16) に変化することが報告されている。⁹³⁾ 著者が検出した分解生成物の ^1H NMR スペクトル、 ^{13}C NMR スペクトルおよび 2 次元 NMR スペクトル (Figs. S1-S3) は simvastatin acid の構造と一致しており、Fig.15 に示すように ^1H NMR シグナルを simvastatin acid の各プロトンに帰属することができた。

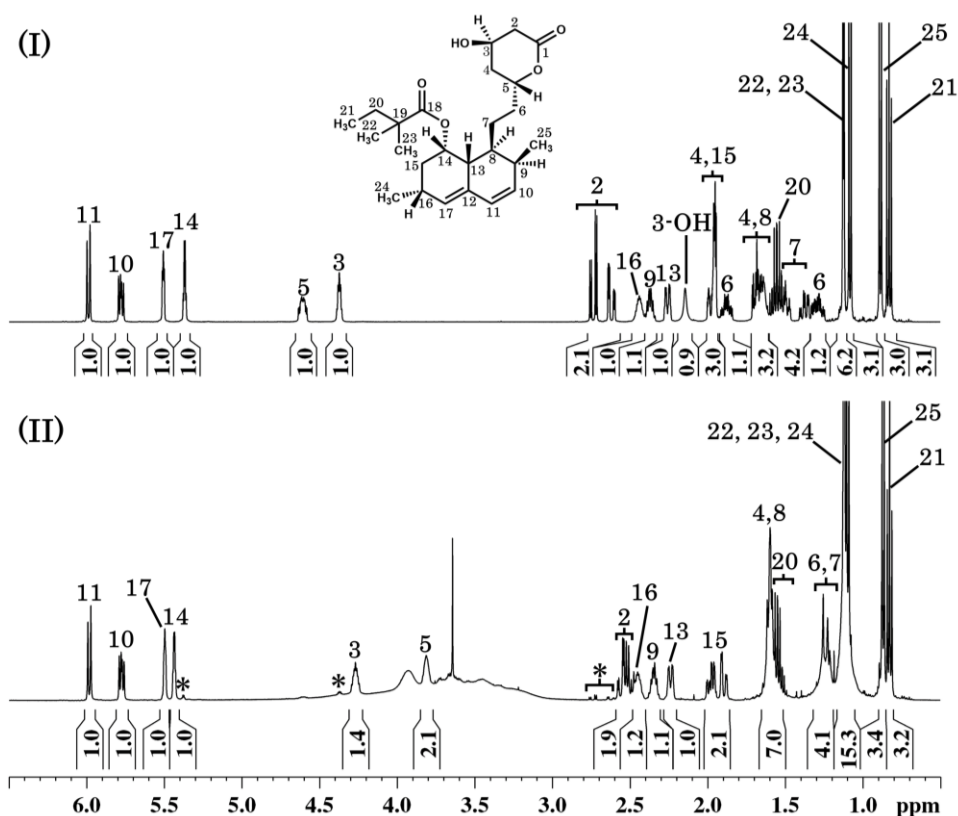


Fig. 15. ^1H NMR spectra of simvastatin (I) and the chloroform extract from the co-suspension of SS and MG (II). The spectra were measured in CDCl_3 . The chloroform extract was found to mainly contain the degradation product, simvastatin acid, with a small amount of simvastatin (signals with asterisks). The chloroform extract was considered to also contain some signals due to the additives of formulations. The numeric characters on the spectra (I) and (II) show assignments of the signals to the positions of the chemical structures of simvastatin and simvastatin acid (Fig. 16), respectively.

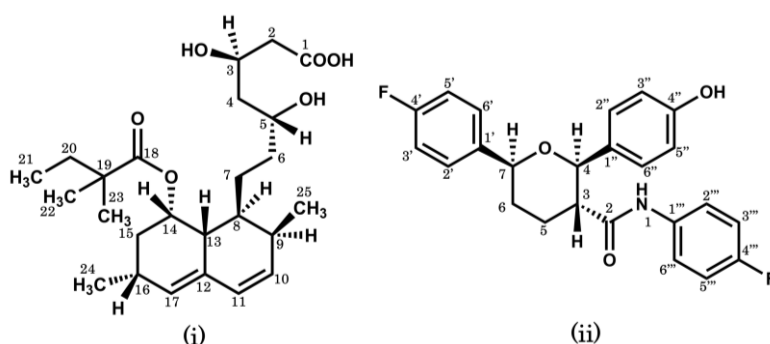


Fig. 16. Chemical structures of the degradation products.
 symbols: i, simvastatin acid; ii, degradation product with a tetrahydropyran skeleton.

Ezetimibe の分解生成物について ^1H NMR を測定したところ, ezetimibe の H5 および H6 に対応するシグナルの化学シフトと形状が大きく変化していることが分かった (Fig. 17). 分解生成物の精密質量を測定したところ m/z 432.1402 ($\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{F}_2\text{NNa}^+\text{O}_3$) に明瞭なピークが観測され, 分子式は ezetimibe と同じ $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{F}_2\text{NO}_3$ であり, 分解生成物は ezetimibe の構造異性体であると推察された. Sánta ら⁹⁴⁾ は, 塩基性メタノール溶液中 (0.1 M NaOH, 80°C, 30 分) において, ezetimibe が分解してテトラヒドロピラン骨格を持つ構造異性体 (Fig. 16 (ii)) に変化することを明らかにした. また, 塩基性水溶液中 (0.01 M NaOH, 40°C) でも同じ化合物が生じることが後に報告された.⁹⁵⁾ 本研究で得られた ^1H NMR スペクトルおよび ^{13}C NMR スペクトル (S4) は Sánta ら⁹⁴⁾ のピラン化合物に関するデータと一致し, Fig. 17 のようにシグナルを帰属することができた. また, 2次元 NMR スペクトルは, その構造を支持した (Figs. S5, S6).

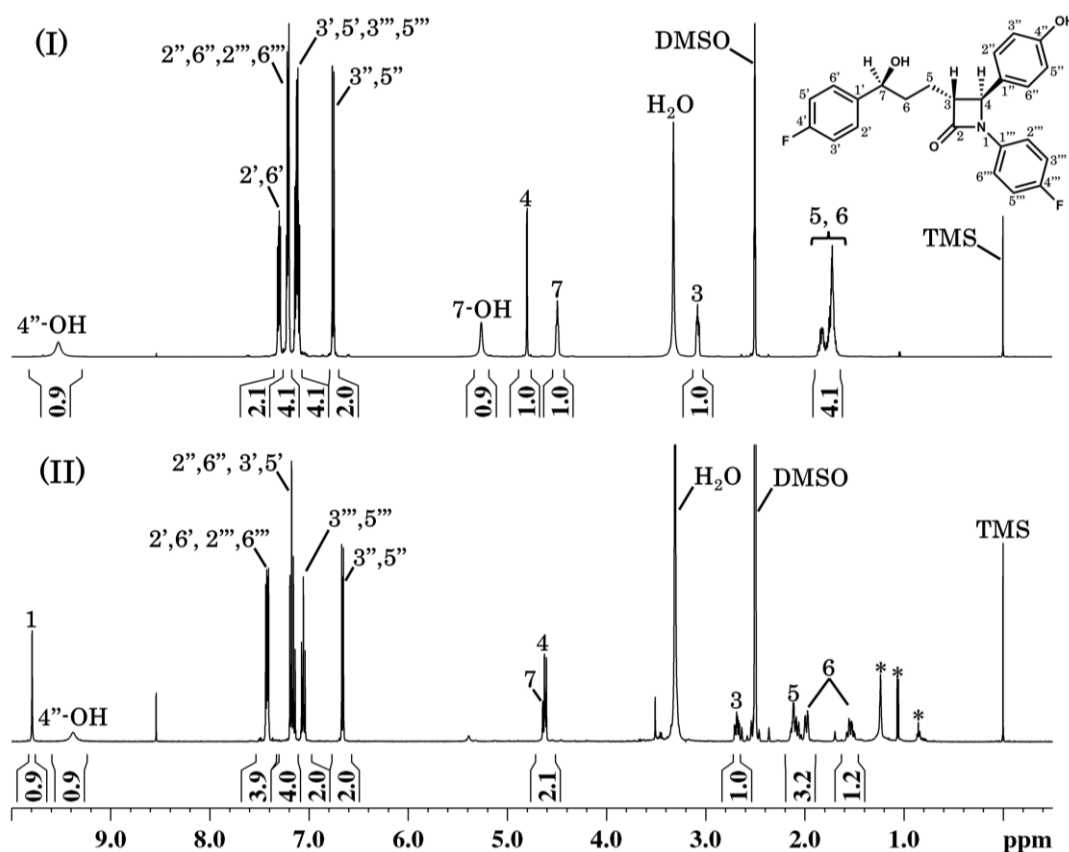


Fig. 17. ^1H NMR spectra of ezetimibe (I) and its degradation product isolated from the co-suspension of EZ and MG (II).

The spectra were measured in $\text{DMSO}-d_6$. The numeric characters on the spectra (I) and (II) show assignments of the signals to the positions of the chemical structures of ezetimibe and the degradation product with a tetrahydropyran skeleton (Fig. 16 (ii)), respectively.

*, impurities.

2-1-3 考察

これまで、MgO との同時懸濁における薬物の化学的安定性に関していくつかの報告がある。⁵¹⁻⁵⁴⁾ 試料処理法は報告によって異なり、懸濁液の一部を採取して処理する場合と、懸濁液全量 (20 mL) を処理する場合がある。MgO を含む懸濁液は懸濁後すぐに沈殿が始まり不均一になるため、前者の方法では正確性に欠ける。よって、正確な定量分析結果を得るためには簡易懸濁液の全量を処理する必要がある。また、薬効成分の化学的变化による減少を知るためには、懸濁液中に存在する薬効成分をすべて回収する必要があるが、MgO が存在する場合、Mg²⁺との間で不溶性の錯体やキレート⁴⁷⁻⁴⁹⁾ あるいは pH の上昇による薬物の化学形の変化による溶解性低下の恐れがある。しかしながら、これまでの研究において、その点が必ずしも十分には考慮されていない。また、定量のための分析法のバリデーションが不十分である。本研究では、懸濁液中に存在する薬物を確実に回収できるように試料処理法を工夫し、バリデーションにより HPLC 分析法の妥当性を確認した。

本研究の対象とした脂質異常症治療薬について、塩基性条件下での化学的安定性に関する多くの報告があり、rosuvastatin 以外は、程度の差はあるものの分解がみられる (Table 11)。しかしながら、それらの報告では標品が用いられており、pH、温度および時間が MgO との同時懸濁の条件とはかなり異なっている。臨床現場では、業務上の理

Table 11 Degradation studies of antidiyslipidemic drugs under alkaline conditions^a

Drug	Condition	Degradation rate (%)	Literature
atorvastatin	1 M NaOH, 60°C, 10 min	4	Khedr et al., 2007 ⁹⁶⁾
pravastatin	1 M NaOH, 80°C, 1 hr	89	Önal et al., 2006 ⁹⁷⁾
rosuvastatin	0.01 M NaOH, 85°C, 10 hr	0	Machairas et al., 2018 ⁹⁸⁾
simvastatin	phosphate buffer (pH 8), 60°C, 1.5 hr	ca. 80 ^b	Álvarez-Lueje et al., 2005 ⁹³⁾
ezetimibe	0.01 M, NaOH, 25°C, 5 min	24	Goel et al., 2013 ⁹⁹⁾

^aAuthentic samples of the drugs were used.

^bThe value was estimated from the chromatogram in the literature.

由により、簡易懸濁液が投与前に長時間放置されることがある。^{54,100)} そこで、本研究では、最大放置時間を 5 時間と想定して、浸漬時間 10 分および 5 時間における懸濁液を調製して分析した。

本研究により、atorvastatin と pravastatin は、それらの製剤と MG の同時懸濁において化学的に安定であることが明らかになった。MgO との同時懸濁における先行研究では、種々の薬物についてエステル部が加水分解を受けることが報告されているが、pravastatin のエステル部についてはそのような反応が起こらないことが分かった。一方、RS と MG の同時懸濁において、浸漬 5 時間後に rosuvastatin の著しい回収率の低下がみられた。Rosuvastatin はかなり苛酷な塩基性条件下でも分解しないことが報告されている。⁹⁸⁾ そのため、回収率低下の理由として、懸濁液中に多量に存在する MgO への rosuvastatin の吸着や、Mg²⁺ と rosuvastatin の間で不溶性の錯体やキレートが生成した可能性が考えられる。⁴⁷⁻⁴⁹⁾ RS と MG の同時懸濁液を投与した場合、上述のような相互作用が胃内でも維持される可能性がある。制酸薬である水酸化マグネシウムと rosuvastatin を同時に服用すると、rosuvastatin の血中濃度が低下することが報告されているが、¹⁰¹⁾ 上述のような相互作用が胃内で生じたことによる消化管吸収の遅れや低下が原因であるかもしれない。

一般に、スタチン類は pH に依存して活性型のヒドロキシ体とラクトン体の間で相互変換が起きることが知られており、^{93,102-104)} 強酸性条件下では、ヒドロキシ体とラクトン体の混合物として、塩基性条件下ではもっぱらヒドロキシ体として存在することが報告されている。Atorvastatin, pravastatin および rosuvastatin はヒドロキシ体であるため、塩基性条件下ではそのままであるが、ラクトン体である simvastatin は塩基性条件下でヒドロキシ体 (simvastatin acid) への分解が起こりうる。Simvastatin は水にほとんど溶けないが、MgO との同時懸濁条件下 (pH ~10) でもヒドロキシ体への分解が起こることが明らかになった。Simvastatin はラクトン体であるため、ヒドロキシ体である simvastatin acid よりも脂溶性が高く消化管からの吸収に優れており、プロドラッグとして使用されている。よって、簡易懸濁液により投与前に simvastatin が simvastatin acid に変化すると吸収過程に影響する。

簡易懸濁液の処理ではメタノールの使用に注意を払う必要がある。Yang ら ¹⁰²⁾ は、simvastatin を 45°C の塩基性含水メタノール溶液 (0.05 M KOH 含有) で 1 時間処理することで simvastatin acid methyl ester が生成することを報告している。本研究において、SS と MG の同時懸濁液を Method I で処理する際にアセトニトリルではなく

メタノールを用いたところ、simvastatin の顕著な分解が起こり（10 分間の浸漬で分解率：約 40%）、HPLC クロマトグラム上には simvastatin (t_R 8.4 min) と simvastatin acid (t_R 6.4 min) 以外に、 t_R 9.3 min にもう 1 つのピークが観測された (Fig. 18). t_R 9.3 min のピークに相当する溶離液を分取して質量分析（精密質量）を行ったところ、 m/z 473.2881 ($C_{26}H_{42}Na^+O_6$) に明瞭なピークが観測されたことから、simvastatin acid methyl ester ($C_{26}H_{42}O_6$) の生成が確認された。また、アセトニトリルを使用した場合と比べて simvastatin acid の生成量がかなり増加していた。これは、塩基性条件下、ラクトン部の加水分解に加えてメタノリシスによる simvastatin の分解が起こり、生じた simvastatin acid methyl ester がさらに加水分解を受けて simvastatin acid に変換された結果であると考えられる。これらの実験結果から、SS の簡易懸濁液の処理にはアセトニトリルを用いた。この例のように、加水分解によりカルボキシ基が生じる場合には、試料処理の段階において塩基性条件下でメタノールを使用すると、分解の程度が過大評価される恐れがある。

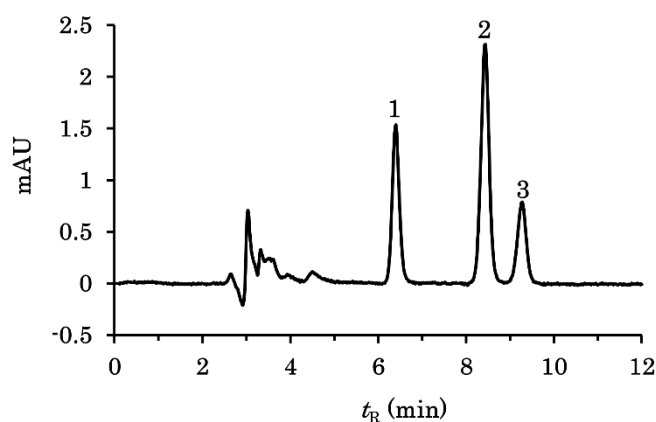


Fig. 18. HPLC chromatogram of aqueous methanolic extract from the co-suspension of SS and MG.

The suspensions were prepared after soak for 10 min.

symbols: 1, simvastatin acid; 2, simvastatin; 3, simvastatin acid methyl ester.

水溶液中における ezetimibe の分解は pH 依存的であり、pH > 12.5 ではβ-ラクタム部の加水分解が起こるが、pH 7-12.5 ではピラン化合物への環変換反応が起こることが報告されている。⁹⁵⁾ 文献では、前述のように、強塩基性条件下 (pH 12) におけるピラン化合物への分解データしか記載されていないが、同じ分解反応が MG との同時懸濁条件下でも僅かに起こることが分った。

簡易懸濁法に用いる温度 55°C は、簡易懸濁液を室温で 10 分間放置した時に、簡易懸濁液の温度がほぼ体温と同じになるように設定されたものである。³⁹⁾ 55°C は 1 つの目安であり、医療現場では温度を毎回測ることはないため、これより高い温度で簡易懸濁液が調製される可能性がある。その場合は、上述の simvastatin や ezetimibe の分解が促進されると考えられる。また、本研究でみられた分解は、水酸化マグネシウムなど他の塩基性薬物との同時懸濁でも生じる可能性があるため注意が必要である。

本研究は脂質異常症治療薬の特定のジェネリック医薬品を扱っているが、先発医薬品や他のジェネリック医薬品でも同様の結果が得られるかどうかに関心もたれる。製剤には酸性および塩基性の様々な添加剤が使用されているが、本研究で検討した脂質異常症治療薬の場合、一部の口腔内崩壊錠を除き、比較的小さな錠剤 (200 mg 未満) が一般に使用される。したがって、各添加剤の量は同時懸濁に用いる MgO (330 mg) よりかなり少ない。そのため、懸濁液の液性や想定される相互作用は、主に MgO に依存すると考えられる。特に pH に関しては、本研究で対象としたいずれの製剤でも同時懸濁液の pH が 10.7 または 10.8 であったことは添加剤の影響が小さいことを示唆している。したがって、ほとんどの先発医薬品やジェネリック医薬品についても本研究と同等の結果が得られると推察される。

本節では、代表的な脂質異常症治療薬の製剤を MgO 製剤と同時に簡易懸濁した場合に、それらの薬効成分が化学的に安定かどうかを検討した。Atorvastatin および pravastatin は MgO との同時懸濁において化学変化をきたすことなく、同時懸濁可能であることが分かった。一方、rosuvastatin は、MgO との長時間の浸漬により何らかの配合変化が生じるため、10 分間で浸漬崩壊させた後、速やかに懸濁液を調製して投与するのが望ましいと考えられる。Simvastatin および ezetimibe に関しては、一部ではあるが分解することから、MgO との同時懸濁を避けることが推奨される。

第2節 酸化マグネシウムとの同時懸濁における抗菌薬の化学的安定性

高齢者は免疫機能低下により感染症にかかりやすいことが知られている。¹⁰⁵⁾ そのため、抗菌薬は高齢者において処方頻度が高い薬物群である。抗菌薬のなかでもβ-ラクタム系抗菌薬は使用頻度が高いが、MgO と同時懸濁した場合に、β-ラクタム環が塩基性条件下で化学的に不安定であることが懸念される。β-ラクタム系抗菌薬にはペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系、ペネム系およびモノバクタム系がある。全国抗菌薬販売量サーベイランス¹⁰⁶⁾によればペニシリン系、セフェム系およびカルバペネム系の使用頻度が特に高い。また、カルバペネム系、ペネム系およびモノバクタム系はほとんどが注射剤である。したがって、ペニシリン系とセフェム系が重要な検討対象である。これまで、抗菌薬と MgO の同時懸濁については、唯一、β-ラクタム系抗菌薬（セフェム系）である cefpodoxime proxetil について報告されているのみであり、⁵²⁾より使用頻度の高いβ-ラクタム系抗菌薬に関する検討が望まれる。本節では、現時点において使用頻度が高いペニシリン系およびセフェム系抗菌薬として、それぞれ amoxicillin および cefcapene pivoxil を対象とし、MgO との同時懸濁における化学的安定性について検討した。

2-2-1 実験の部

2-2-1-1 試薬

抗菌薬製剤として、AMOXICILLIN CAPSULES 250mg “TOWA”（東和薬品）および CEFCAPENE PIVOXIL HYDROCHLORIDE Tablets 100 mg [SW]（沢井製薬）を用いた。以後、これらの製剤をそれぞれ AMX, CFPN と呼ぶ。各製剤の成分を Table 12 に示す。Amoxicillin trihydrate（純度：100%）と cefcapene pivoxil hydrochloride monohydrate（純度：98.5%）は東京化成（東京）より購入した。親水性メンブレンフィルター DISMIC[®]-03CP (0.45 μm) は東洋濾紙（東京）より購入した。MgO 製剤、弱酸性陽イオン交換樹脂およびその他の試薬は第1節と同じものを用いた。

Table 12 Composition of formulations

Formulation	Ingredient ^a
AMX	<u>amoxicillin hydrate</u> 250 mg (titer), lactose hydrate, magnesium stearate, red No. 3, yellow No. 5, blue No. 1, sodium lauryl sulfate, gelatin, titanium oxide
CFPN	<u>cefcapene pivoxil hydrochloride hydrate</u> 100 mg (titer), sucrose, carmellose calcium, titanium oxide, red ferric oxide, magnesium stearate, talc, corn starch, hydroxy propyl cellulose, hypromellose, macrogol 6000

^aThe medicinal ingredients are underlined.

2-2-1-2 装置

2-1-1-2 に準ずる.

2-2-1-3 簡易懸濁液の調製

2-1-1-3 に準ずる.

2-2-1-4 簡易懸濁液の処理

AMX 単独 (1 カプセル) の簡易懸濁液, または AMX (1 カプセル) と MG (1 錠) の同時懸濁液を遠沈管からすべてビーカーに移し, 遠沈管を蒸留水 180 mL で洗浄し, 洗浄液を同じビーカーに入れた. 超音波処理を 2 分間行った後, 4 本の 50 mL 遠沈管に小分けし, 遠心分離 (13000 × g) を 5 分間行った, 第 1 節と同様に上清 (抽出液) を弱酸性陽イオン交換樹脂を充填したカラムに通した. カラム溶出液が中性であることを pH 試験紙で確認した. カラム溶出液を蒸留水で全量を 500 mL とし, その一部をとり, 蒸留水で 10 倍に希釈した.

CFPN 単独 (1 錠) の簡易懸濁液, または CFPN (1 錠) と MG (1 錠) の同時懸濁液を遠沈管からすべてビーカーに移し, 遠沈管をメタノール 80 mL で洗浄し, 洗浄液を同じビーカーに入れた. AMX の場合と同様に, 超音波処理, 遠心分離および弱酸性陽イオン交換カラムによる処理を行い, カラム溶出液をメタノールで全量 200 mL とした. その一部をとり, メタノールで 50 倍に希釈した.

また, 別の実験として, 55°C に加温した蒸留水 20 mL が入った 300 mL ナス型フラスコに, CFPN (1 錠) と MG (1 錠) を浸漬し, ナス型フラスコ全体をアルミホイルで覆い 10 分間あるいは 5 時間放置して簡易懸濁液を調製した. ロータリーエバポレ

ーターおよび真空ポンプを用いて室温にて懸濁液を濃縮乾固し、残渣にメタノール 100 mL を加え、超音波処理を 5 分間行った。その溶液の一部をとり、メタノールで 100 倍に希釈した。

2-2-1-5 HPLC 分析

逆相 HPLC の移動相は Injac ら¹⁰⁷⁾ の報告を参考に設定した (Table 13)。移動相の流速は 1.0 mL/min, カラムオープンの温度は 25°C に設定した。2-2-1-4 で調製した試料をメンブレンフィルターでろ過後, HPLC に 10 μ L を注入した。クロマトグラムは, 懸濁液調製後 30 分以内を取得した。絶対検量線法により定量し, 第 1 節に従って回収率を求めた。分解生成物の単離精製には, Waters 社 (Milford, MA, USA) のセミ分取用逆相系 Atlantis T3 カラム (250 \times 10 mm i.d., 5 μ m) を, Atlantis T3 ガードカラム (10 \times 10 mm i.d., 5 μ m) を装着して用い, 流速 4.8 mL/min, 注入量 300-500 μ L とした。移動相の組成は Table 13 と同じであった。

Table 13 Reversed-phase HPLC conditions

Formulation	Composition of mobile phase ^a	Wavelength ^b (nm)
AMX	84/16	230
CFPN	62/38	262

^a 0.1% TFA / acetonitrile

^b Wavelengths used to draw the chromatograms

2-2-1-6 HPLC 分析法のバリデーション

Amoxicillil の水溶液 (616.2 μ g/mL) および cefcapene pivoxil のメタノール溶液 (718.8 μ g/mL) を調製して (純度で補正), 各薬物の標準溶液とし, 適宜希釈してバリデーションに用いた。2-2-1-4 の試料処理によって amoxicillin および cefcapene pivoxil の表示量が製剤から完全に回収された場合の HPLC 注入試料の薬物濃度は, それぞれ 50 μ g/mL および 10 μ g/mL であった。そのため, これらの濃度を中心に段階的に 5 種類の濃度の溶液を調製し, 3 回ずつ HPLC に注入したときのピーク面積に基づいて検量線を作成した。日内変動および日間変動は, 検量線の範囲内における 3 種類の濃度 (高濃度, 中濃度, 低濃度) の溶液を調製し, 各濃度について, 異なる 3 日にそれぞれ 5 回測定して求めた。LOD および LOQ を測定するために, 検出限界または定量限界付

近 (amoxicillin: 50-150 ng/mL, cefcapene pivoxil: 23-47 ng/mL) で 3 種類の濃度の溶液を調製し、各溶液を HPLC に 3 回ずつ注入した時のピーク面積に基づいて検量線を作成した。その回帰直線の残差の標準偏差 (S.D.) および傾き S を求めた。得られた値を下式に代入し LOD および LOQ を算出した。

$$\text{LOD} = 3.3 \times \text{S.D.} / S$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{S.D.} / S$$

2-2-1-7 amoxicillin に由来する分解生成物の構造解析

AMX (1 カプセル) と MG (1 錠) の同時懸濁液を 2-2-1-4 に準じて処理し、得られた抽出液を、ロータリーエバポレーターを用いて室温下で濃縮乾固した。残渣を蒸留水で溶解し、セミ分取カラムを装着した HPLC に注入して分解生成物のピークに相当する溶離液を分取した後、ロータリーエバポレーターを用いて室温下で濃縮乾固した。残渣を $\text{DMSO-}d_6$ に溶解して、第 1 節と同じ装置と方法で NMR を測定した。また、分取した画分について、質量スペクトルおよびタンデム質量スペクトル (MS/MS) を測定した。Amoxicillin の標品についても同じ条件で各種スペクトルを測定し分解生成物のスペクトルと比較した。

2-2-1-8 統計解析

2-1-1-8 に準ずる。

2-2-2 結果

2-2-2-1 簡易懸濁液の調製

本研究の対象とした抗菌薬は、塩基に不安定なβ-ラクタム部とともにカルボキシ基など配位基となりうる部分構造を有している (Fig. 19). AMX および CFPN は、単剤の懸濁においても MG との同時懸濁においても 10 分間で崩壊し、懸濁液を容易に調製することができた. 簡易懸濁液を遠心分離して得た上清の pH を測定したところ、単独で懸濁した場合は両剤とも酸性を示したが、MG と同時懸濁した場合はどちらも弱塩基性を示した (Table 14).

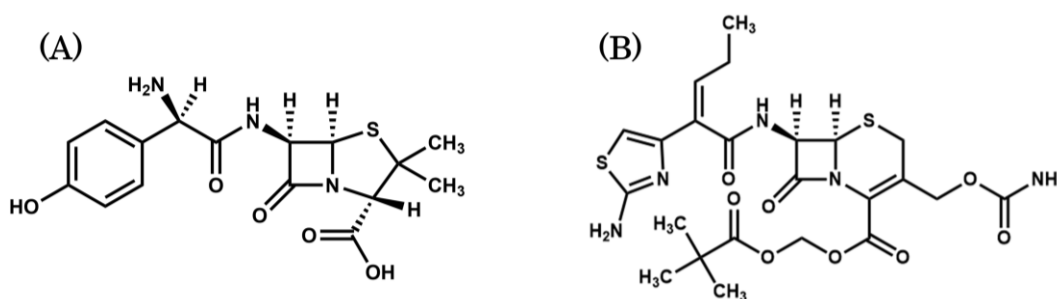


Fig. 19. Chemical structures of β-lactam antibiotics examined.

symbols: A, amoxicillin; B, cefcapene pivoxil.

Table 14 pH values of supernatants of the simple suspensions prepared after soak for 10 min^a

Formulation	pH	
	without MG	with MG
AMX	5.6 ± 0.04	10.1 ± 0.03
CFPN	2.9 ± 0.03	9.7 ± 0.03

^aEach formulation (one tablet or capsule) was subjected three times to the simple suspension method with or without MG (one tablet). The values are shown as mean ± standard deviation.

2-2-2-2 簡易懸濁液の処理および HPLC 分析

第 1 節の方法に従って、簡易懸濁液を多量の溶媒で希釈して抽出し、陽イオン交換樹脂を用いて中和した後、HPLC で分析した。Figure 20 のパネル a, b, c に示すように、単剤では amoxicillin のピーク (t_R 7.1 min) のみが観測されたが、MG との同時懸濁では、浸漬 10 分後に、amoxicillin のピーク以外に t_R 5.3 min, 6.3 min, 11.8 min に amoxicillin の分解生成物と考えられるピーク (それぞれ D1, D2, D3) が観測された。いずれのピークも 5 時間後にはピーク強度が大幅に増加した。なお、AMX と MG の同時懸濁液 (浸漬 10 分) の上清を、抽出や中和の処理をせずに直ちに HPLC で分析した場合でも同様の分解生成物が確認された (Fig. 20 のパネル d)。D1 と D2 は amoxicillin よりも保持時間が短いことから、 β -ラクタム部の加水分解などにより親水性が増加した化合物であり、D3 は逆に保持時間が長いことから疎水性が増加したものであると推察された。CFPN の場合は、MG との同時懸濁の有無にかかわらず、どの波長においても、cefcapene pivoxil のピーク (t_R 8.2 min) のみが観測され、分解生成物のピークは観測されなかったが、同時懸濁ではピーク強度が減少した (Fig. 20 のパネル e, f, g)。

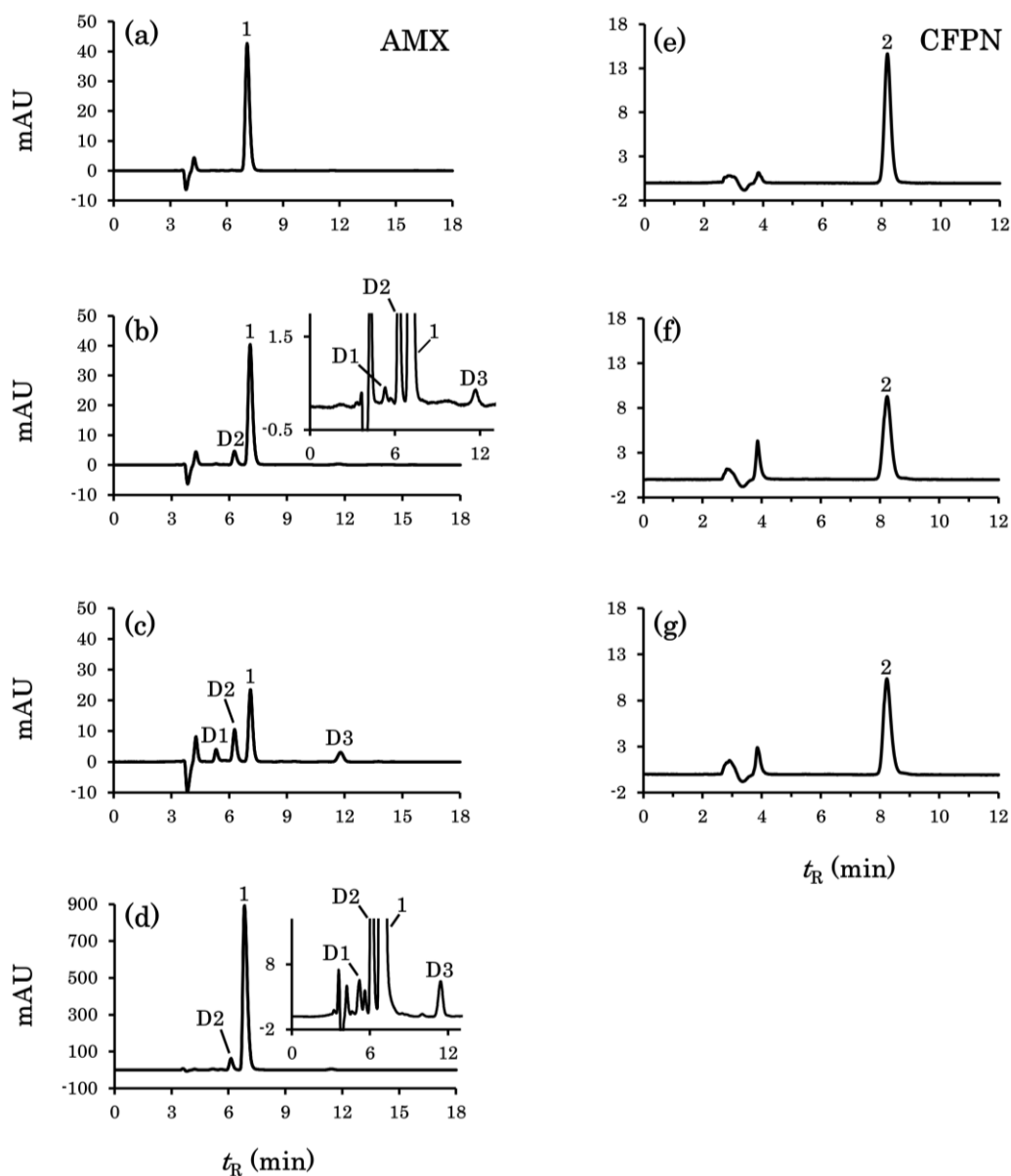


Fig. 20. HPLC chromatograms of AMX (left) and CFPN (right) suspended with or without MG under the condition of simple suspension method.

The suspensions of the following formulations were prepared and treated, and the resulting solutions were analyzed by HPLC. a: AMX; b, c, and d: AMX+MG; e: CFPN; f, and g: CFPN+MG. a, b, d, e, and f: 10min soakage; c and g: five hr soakage. The panel d shows the chromatogram of the aqueous supernatant immediately after the preparation of co-suspension. The insets in panels b and d show the enlarged views. The mobile phases and wavelengths; see Table 13. symbols: 1, amoxicillin; 2, cefcapene pivoxil; D1, D2, and D3, degradation products.

HPLC ピーク面積に基づいて懸濁液中の薬効成分を定量し、回収率を求めた (Table 15). その結果, AMX, CFPN とともに単剤で懸濁した場合の回収率は, 浸漬 10 分後 99% であり, 浸漬 5 時間後に有意な減少は認められなかった. AMX を MG と同時懸濁した場合の回収率は, 浸漬 10 分後に有意に減少し, 5 時間後には約 50% に低下した. CFPN を MG と同時懸濁した場合は, cefcapene pivoxil の回収率は再現性が悪く, 単剤の場合よりもかなり低下した. しかしながら, 2-2-1-4 に記載したように, CFPN と MG の同時懸濁液を濃縮乾固して水を除いた上で, メタノールで再溶解して HPLC で測定したところ, 回収率は浸漬 10 分後および 5 時間後ともに約 95% に増加した.

Table 15 Quantitative determination of the medicinal ingredients in the simple suspensions^a

Formulation	without MG (%)		with MG (%)	
	after 10 min	after five hr	after 10 min	after five hr
AMX	98.6±3.0	96.7±1.1	91.8±1.3*	50.6±1.0**,†
CFPN	98.9±1.8	96.7±1.2	74.8±4.6*	84.6±4.9**,†
	-	-	95.1±3.8 ^b	94.0±2.2 ^b

^aThe values are shown as mean ± standard deviation of three experiments.

^bThe co-suspensions of CFPN and MG were evaporated to dryness, and the residues were analyzed after redissolved in methanol.

* $p < 0.05$ vs. after 10 min without MG

** $p < 0.05$ vs. after five hr without MG

† $p < 0.05$ vs. after 10 min with MG

2-2-2-3 HPLC 分析法のバリデーション

日内変動および日間変動を検討したところ, いずれの薬物でも測定値の相対標準偏差は 2.0% 以下であった (Table 16). 検量線は, 両薬物ともに良好な直線性 ($r^2 > 0.999$) を示した (Table 17). Amoxicillin の LOD および LOQ は, 2-2-1-6 の式において, S.D. = 72.75, S = 9.29 より, それぞれ 26 ng/mL および 78 ng/mL であった. Cefcapene pivoxil の LOD および LOQ は, S.D. = 23.05, S = 28.13 より, それぞれ 2.7 ng/mL および 8.2 ng/mL であった (Table 17). これらのバリデーション結果は, 本研究の目的を果たすうえで許容範囲内であった.

Table 16 Intra- and inter-day precision^a

Drug	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day				Inter-day			
		Mean ($\mu\text{g/mL}$)	Standard deviation	Relative standard deviation (%)	Bias ^b (%)	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	Standard deviation	Relative standard deviation (%)	Bias ^b (%)
amoxicillin	10.0	10.2	0.07	0.6	2.1	10.1	0.09	0.9	1.2
	50.0	48.7	0.23	0.5	-2.6	48.7	0.32	0.7	-2.7
	100.1	96.4	0.62	0.6	-3.6	96.3	0.64	0.7	-3.6
cefcape	1.8	1.9	0.02	1.0	3.0	1.8	0.02	1.2	2.4
pivoxil	14.3	14.7	0.06	0.4	2.3	14.8	0.12	0.8	3.3
	28.7	30.1	0.09	0.3	4.8	29.5	0.61	2.0	3.0

^aThe quality control samples were analyzed five times using the HPLC system for the intra-day precision, and such experiments were performed on three different days for the inter-day precision.

^bThe differences between the sample concentrations and the measured ones.

Table 17 Calibration curve, LOD and LOQ

Drug	Slope	Intercept	r^2	Concentration range ($\mu\text{g/mL}$)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
amoxicillin	13941	-4083	0.9992	7.7-123	26	78
cefcapene pivoxil	23422	1603	0.9992	1.8-28.7	2.7	8.2

2-2-2-4 amoxicillin に由来する分解生成物の構造解析

AMX と MG の同時懸濁における分解生成物 (D1, D2, D3) の構造を明らかにするために、セミ分取カラムを装着した HPLC により、各分解生成物のピークに相当する溶離液を分取した。各画分を濃縮乾固せずに HPLC で分析すると、それぞれ目的の分解生成物に由来するピークのみが観測された。一方、各画分を濃縮乾固して、アセトニトリル/水 (1:1) で再溶解後に HPLC で分析すると、D3 の画分は幅広い単一のピークを示し、D1 および D2 の画分については amoxicillin, D1 および D2 に相当する 3 本のピークが観測された。この結果から、溶離液中の TFA による酸性条件下において、amoxicillin, D1 および D2 は相互に変換することが分かった。そこで、D1 および D2 の画分については、濃縮乾固せずに、質量分析計で直接分析した。その結果、D1 では H^+ 付加体 (m/z 384.1233) および Na^+ 付加体 (m/z 406.1057) のピークが観測され、D1 の分子式は $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ であることが示唆された。一方、D2 では、 H^+ 付加体 (m/z 384.1221) および Na^+ 付加体 (m/z 406.1042) のピークが観測されたことから、D2 の分子式は D1 と同じであることが分かった。また、D1 と D2 の分子量は、amoxicillin ($\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$) よりも 18 (水分子) 多いことから、D1 および D2 は β -ラクタム部が加水分解されて生成したものであると推察された。Pérez-Parada ら¹⁰⁸⁾ は、amoxicillin はアンモニア水中 (pH 10) において、 β -ラクタム部が加水分解を受けて amoxicilloic acid (Fig. 21) に変化することを報告しており、その分子式は D1 および D2 と一致する。また、amoxicilloic acid は 5 位における立体配置が反転してジアステレオマーの混合物になることが知られている。¹⁰⁹⁾ D1 および D2 の MS/MS を測定したところ、amoxicilloic acid の MS/MS¹¹⁰⁾ と一致した (Table 18)。

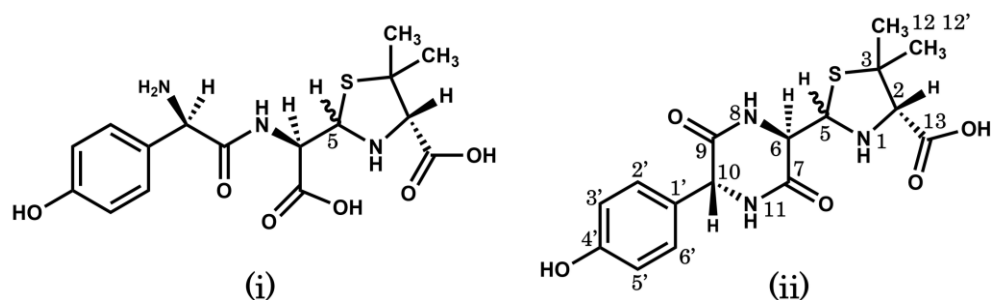


Fig. 21. Chemical structures of the degradation products.

Symbols: i, (5*R*)- and (5*S*)-amoxicilloic acid; ii, (5*R*)- and (5*S*)-amoxicillin diketopiperazine

Table 18 Accurate mass obtained from MS/MS of D1 and D2^a

Formula	Calculated mass (<i>m/z</i>)	Experimental mass (<i>m/z</i>)	
		D1	D2
C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₆ S	367.0958	367.0980 (-2.2)	367.0949 (0.9)
C ₁₅ H ₂₂ N ₃ O ₄ S	340.1326	340.1332 (-0.6)	340.1309 (1.7)
C ₁₅ H ₁₉ N ₂ O ₄ S	323.1060	323.1078 (-1.8)	323.1054 (0.6)
C ₇ H ₁₃ N ₂ O ₂ S	189.0692	189.0704 (-1.2)	189.0689 (0.3)
C ₆ H ₁₀ NO ₂ S	160.0427	160.0433 (-0.6)	160.0426 (0.1)

^aThe applied collision energies for D1 and D2 were 16 eV and 18 eV, respectively. The errors (mDa) are shown in the parentheses.

D3 の ¹H NMR スペクトル (Fig. 22) を測定したところ、amoxicillin のβ-ラクタム部 (H5, H6) に対応するシグナルの高磁場シフトが観測された。このことは、D3 はβ-ラクタム部が開裂した生成物であることを示唆した。Amoxicillin はアンモニア水中 (pH 10) において、上述の amoxicilloic acid 以外に、β-ラクタム環の開裂 (amoxicilloic acid の生成) を介して amoxicillin の構造異性体である amoxicillin diketopiperazine (C₁₆H₁₉N₃O₅S) のジアステレオマー混合物 (Fig. 21) に分解することが報告されている。^{108,111,112} D3 の ¹H NMR スペクトルは、amoxicillin diketopiperazine の文献データと良く一致し、Fig. 22 のようにシグナルを帰属することができた。¹³C NMR スペクトルおよび 2 次元 NMR スペクトルの測定結果からもその構造が支持された (Figs. S7-S9)。また、D3 の質量分析では、Na⁺ 付加体 (*m/z* 388.0916) のピークが観測され、分子式は C₁₆H₁₉N₃O₅S であることが確認された。

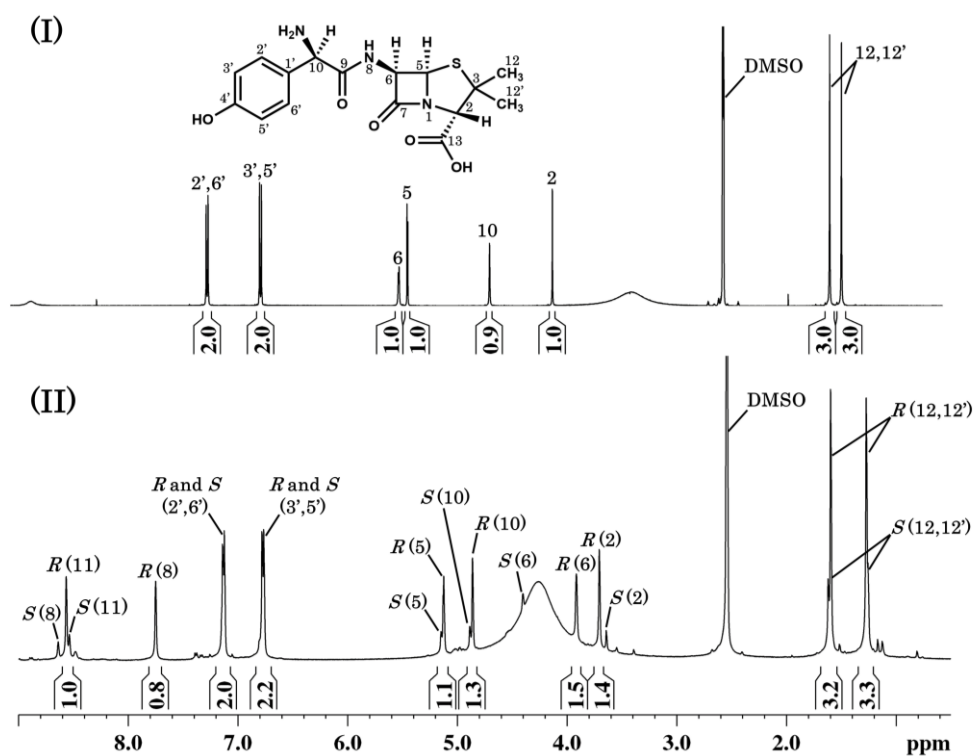


Fig. 22. ¹H NMR spectra of amoxicillin (I) and its degradation product (D3) isolated from the co-suspension of AMX and MG (II).

The spectra were measured in DMSO-*d*₆. The major signals due to (5*R*)-amoxicillin diketopiperazine were observed with the minor ones due to the (5*S*)-diastereomer. The characters on the spectra (I) and (II) show assignments of the signals to the positions of the chemical structures of amoxicillin and amoxicillin diketopiperazine (Fig. 21), respectively.

2-2-3 考察

Amoxicillin が塩基性条件下で分解することは、いくつかの研究グループによって報告されているが、いずれも強塩基性条件下における結果である (Table 19). 本節での実験により、MG との同時懸濁条件下においても分解が進行することが分かった。また、文献と同様に β -ラクタム環が開裂して amoxicilloic acid と amoxicillin diketopiperazine に変化することが明らかになった。第 1 節において、分解によりカルボキシ基が生じる可能性がある場合は、メタノールの使用に注意する必要があると述べたが、amoxicillin はそのもう 1 つの例である。Amoxicillin を塩基性含水メタノール溶液中 (0.015 M NaOH 含有) で室温下 15 分間処理すると、amoxicillin acid methyl ester が生じることが報告されているため、¹¹³⁾ 本研究では抽出処理にメタノールではなく蒸留水を用いた。MG との同時懸濁における分解率は、浸漬 10 分では 10% 程度であるが、浸漬時間が長いと大幅に増加し、抗菌作用に必要な β -ラクタム環が失われることが判明した。Amoxicillin の分解生成物は抗菌作用を有しておらず、また、何らかの毒性を示す可能性が否定できないことから、両者の同時懸濁は避けるべきである。他のペニシリン系抗菌薬である、ampicillin, bacampicillin および sultamicillin においても MG との同時懸濁によって分解が生じる可能性があるため検証が必要である。

Table 19 Degradation studies of amoxicillin under alkaline conditions^a

Literature	Condition	Degradation rate (%)
Gallo et al., 2021 ¹¹³⁾	1.5 M NaOH, 25°C, 15 min	99
Raju et al., 2009 ¹¹⁴⁾	0.5 M NaOH, 25°C, 2 min	87
Tippa et al., 2010 ¹¹⁵⁾	0.1 M NaOH, 0 min	6.2
Freitas et al., 2012 ¹¹⁶⁾	1 M NaOH, 55°C, 24 hr	100

^aAuthentic sample of amoxicillin was used.

CFPN と MG の同時懸濁では、分解ピークが認められないにもかかわらず、薬効成分の回収率はかなり低かった。CFPN 中に含まれる cefcapene pivoxil hydrochloride はメタノールに溶けやすいため、抽出溶媒としてメタノールを用いたが、塩基性の簡易懸濁液中では本物質は分子形になるため、抽出液中に存在する水により溶解性が低下したと考えられた。そこで、簡易懸濁液の水を除いてメタノールのみで処理したところ、約 95% の回収率が得られた。著者の知る限り、塩基性条件下における cefcapene pivoxil の化学的安定性に関する報告はない。本薬物と同じセフェム系抗菌薬であり構造が酷似している cefpodoxime proxetil について、MgO と同時懸濁を行うと分解することが報告されている。⁵²⁾ しかしながら、懸濁液の一部を採取して HPLC 分析しているため正確性に欠けること、薬効成分を定量的に回収できていないこと、および分解物の生成をクロマトグラム上で確認していないことなどから、再検証が必要であると考えられる。

本研究では、AMX および CFPN の製剤として特定のジェネリック医薬品を用いた。第 1 節でも述べたが、これらの製剤においても、先発医薬品および他のジェネリック医薬品を含めて、添加剤の量が MgO よりもかなり少ない。また、cefcapene pivoxil のジェネリック医薬品および先発医薬品では、添加剤がほぼ共通している。よって、AMX および CFPN 以外の製剤においても、本研究と同様の結果が得られると推察される。

本節では、抗菌薬である amoxicillin および cefcapene pivoxil の製剤を MgO 製剤と同時に簡易懸濁した場合に、それらの薬効成分が化学的に安定かどうかを検討した。その結果、amoxicillin は一部分解することが明らかになったことから、MgO との同時懸濁は避けるのが望ましいと考えられる。一方、cefcapene pivoxil の分解生成物は検出されなかったが、MgO による塩基性条件下で生じる分子形の水溶性が極めて低いため、栄養チューブの透過性や投与後の吸収過程への影響が懸念される。

総括

本研究では、抗がん薬の調製に伴って生じる汚染の除去方法および嚥下困難患者に適用する簡易懸濁法の化学的配合変化に関わる臨床疑問を取り上げ、分析化学的視点を重視して研究を行い、以下の成果を得た。

第1章では、抗がん薬の除染剤として日本の多くの病院に導入されたオゾン水について、抗がん薬に対する分解不活化効果を検討した。使用頻度の高い11種類の抗がん薬について、それらの注射剤を試料として、一定の条件のもとオゾン水と反応させ、反応混合物をHPLCで分析した。その結果、オゾン水はいずれの薬物に対しても分解効果を示したが、その効果は抗がん薬の構造および添加剤の影響を大きく受けることが明らかになった。特に、docetaxelとpaclitaxelについては、分解が極めて困難であり、その原因として、二重結合を持つ多量の添加剤がオゾン消費したことが推察された。Docetaxelとpaclitaxel以外について、変異原性試験および細胞毒性試験により不活化効果を評価したところ、オゾン水処理によって毒性がむしろ増加する薬物(pemetrexed, cisplatin, cyclophosphamide, ifosfamide)が存在することが示された。以上の検討結果より、オゾン水の使用にあたっては、あらかじめ効果を検証した上で、対象薬物を限定する必要性が示唆された。

第2章では、高齢者において処方頻度の高い薬物として脂質異常症治療薬と抗菌薬に焦点をあて、塩基性の緩下剤であるMgOと同時に簡易懸濁した場合の化学的配合変化について検討した。具体的には、脂質異常症治療薬として代表的なスタチン類(atorvastatin, pravastatin, rosuvastatin, simvastatin)とezetimibe、抗菌薬としてβ-ラクタム系抗菌薬(amoxicillin, cefcapene pivoxil)を対象とした。これらの薬物の固形製剤を試料として用い、常法に従ってMgO製剤と同時に懸濁を行いHPLCで分析したところ、atorvastatinおよびpravastatinは、長時間の浸漬でも分解ピークはみられず同時懸濁に問題はないことが分かった。一方、simvastatin, ezetimibeおよびamoxicillinは、所定の浸漬時間(10分間)において、部分的に分解することが判明した。特に、amoxicillinは、5時間の浸漬により同時懸濁液を調製した場合は、約50%も分解することが分かった。分解生成物の構造を質量分析およびNMR測定によって解析したところ、いずれも塩基性条件下における既知の分解生成物であった。Simvastatin, ezetimibeおよびamoxicillinは、MgOとの同時懸濁を避けるのが望ましいと考えられる。また、rosuvastatinとcefcapene pivoxilについては、MgOとの

同時懸濁により分解ピークは認められないが、前者は何らかの配合変化を生じるため、速やかに懸濁液を調製して投与することが推奨され、後者は塩基性条件下で生じる分子形の水溶性が極めて低いため、経管投与や投与後の吸収過程への影響が懸念される。本研究では、特定のジェネリック医薬品について検討したが、得られたデータは、他のジェネリック医薬品と MgO の同時懸濁に対しても参考になる。超高齢社会において簡易懸濁法の重要性は高まることから、化学的配合変化に関してさらにデータを蓄積することが望まれる。

以上、本研究では、分析化学的見地から調剤業務の臨床疑問の解決に向けて取り組むことにより、患者のみならず薬剤師にとって正確で有益な情報を提供することができた。

謝辞

本研究にあたり，終始御懇切なる御指導，御鞭撻を賜りました，恩師，松山大学薬学部 明樂 一己 教授に衷心から感謝の意を表します。

また，本研究遂行の課程で多大なる御指導，御助言を賜りました，松山大学薬学部 見留 英路 准教授に深く感謝致します。

変異原性試験の実施にあたり御協力，御助言を賜りました，松山大学薬学部 舟橋 達也 教授，田邊 知孝 准教授に心より御礼申し上げます。また，細胞毒性を測定して頂いた，横浜薬科大学 波多江 典之 教授に心より感謝致します。

研究の遂行にあたり，多大なる御協力を賜りました，国立病院機構四国がんセンター薬剤部 元 薬剤部長 山本 宏 氏（現 国立病院機構四国こどもとおとなの医療センター薬剤部長），前 薬剤部長 小池 恭正 氏，榎 恒雄 氏（現 国立病院機構広島西医療センター薬剤部長），佐々木 祐太 氏（現 国立病院機構大阪南医療センター薬剤部），長谷部 匡史 氏，愛媛大学医学部附属病院薬剤部 薬剤部長 田中 守 准教授，副薬剤部長 飛鷹 範明 助教ならびに諸先生方に謹んで感謝申し上げます。

製剤の観点からの貴重な御助言を賜りました松山大学薬学部 坂本 宜俊 教授，中村 承平 准教授，山内 行玄 准教授に感謝致します。

本研究の遂行にあたり，種々の御協力を頂きました松山大学薬学部 薬品分析化学研究室諸氏に感謝致します。

大学院研究成果報告会にて，御助言を賜りました松山大学薬学部教員の皆様に心より御礼申し上げます。

最後に，これまで私を支えてくれた家族ならびに友人に心より感謝致します。

研究成果の掲載紙

本学位論文は学術雑誌に掲載した以下の論文を中心にまとめた。

1. Kato G, Mitome H, Shigematsu S, Utsunomiya A, Shimasaki M, Sasaki Y, Maki T, Yamamoto H, Tanabe T, Funahashi T, Hatae N, Hidaka N, Tanaka M, Akira K, Degradation and inactivation efficacy of ozone water for antineoplastic drugs in hospital settings. *J. Oncol. Pharm. Pract.*, **28**, 1781-1789 (2022).
2. Kato G, Mitome H, Teshima K, Tawa K, Hakuba Y, Tanabe T, Funahashi T, Hatae N, Koike Y, Hasebe M, Hidaka N, Tanaka M, Akira K, Study on the use of ozone water as a chemical decontamination agent for antineoplastic drugs in clinical settings. *Ann. Work Expo. Health*, **67**, 241-251 (2023).
3. Kato G, Mitome H, Miyauchi Y, Takeda S, Toyota Y, Hidaka N, Tanaka M, Akira K, A study on the chemical stability of cholesterol-lowering drugs in concomitant simple suspensions with magnesium oxide. *J. Pharm. Health Care Sci.*, **9**, 32 (2023).

*Springer Nature の承諾を得て、本投稿論文の内容を学位論文の一部として用いた。

The contents of the above paper were reproduced in this thesis with permission from Springer Nature.

引用文献

- 1) 日本学術会議, 提言 持続可能な医療を担う薬剤師の職能と生涯研鑽, 令和 2 年 9 月 4 日. <https://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-24-t296-2.pdf>
- 2) Koller M, Böhlandt A, Haberl C, Nowak D, Schierl R, Environmental and biological monitoring on an oncology ward during a complete working week. *Toxicol. Lett.*, **298**, 158-163 (2018).
- 3) Graeve CU, McGovern PM, Alexander B, Church T, Ryan A, Polovich M, Occupational exposure to antineoplastic agents. *Workplace Health Saf.*, **65**, 9-20 (2017).
- 4) Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, **71**, 209-249 (2021).
- 5) Connor TH, Lawson CC, Polovich M, McDiarmid MA, Reproductive health risks associated with occupational exposures to antineoplastic drugs in health care settings: a review of the evidence. *J. Occup. Environ. Med.*, **56**, 901-910 (2014).
- 6) Swift LH, Golsteyn RM, Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 3403-3431 (2014).
- 7) The National Institute for Occupational Safety and Health, Preventing occupational exposures to antineoplastic and other hazardous drugs in health care settings, DHHS (NIOSH) Publication number 2004-2165, September 2004, <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2004-165/default.html>
- 8) El-Ebiary AA, Abuelfadl AA, Sarhan NI, Evaluation of genotoxicity induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes of oncology nurses and pharmacists. *J. Appl. Toxicol.*, **33**, 196-201 (2013).

- 9) Santos AN, Oliveira RJ, Pessatto LR, Gomes RDS, Freitas CAF, Biomonitoring of pharmacists and nurses at occupational risk from handling antineoplastic agents. *Int. J. Pharm. Pract.*, **28**, 506-511 (2020).
- 10) Hu J, Zhao F, Liu L, Huang H, Huang X, The meta-analysis of sister chromatid exchange as a biomarker in healthcare workers with occupational exposure to antineoplastic drugs. *Medicine (Baltimore)*, **102**, e34781 (2023).
- 11) Fransman W, Roeleveld N, Peelen S, de Kort W, Kromhout H, Heederik D, Nurses with dermal exposure to antineoplastic drugs: Reproductive outcomes. *Epidemiology.*, **18**, 112-119 (2017).
- 12) Liu S, Huang Y, Huang H, Hu S, Zhong X, Peng J, Zhang X, Huang X, Influence of occupational exposure to antineoplastic agents on adverse pregnancy outcomes among nurses: A meta-analysis. *Nurs. Open*, **10**, 5827-5837 (2023).
- 13) Power LA, Coyne JW, ASHP Guidelines on Handling Hazardous Drugs. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, **75**, 1996-2031 (2018).
- 14) US Pharmacopeia, USP General Chapter <800> Hazardous Drugs-Handling in Healthcare Settings.
https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/gc-800-rb-notice-20190531.pdf
- 15) ISOPP standards for the safe handling of cytotoxics. *J. Oncol. Pharm. Pract.*, **28**, 1-126 (2022).
- 16) 日本がん看護学会, 日本臨床腫瘍学会, 日本臨床腫瘍薬学会, がん薬物療法における曝露対策合同ガイドライン 2015年版. 金原出版.
- 17) Queruau Lamerie T, Nussbaumer S, Décaudin B, Fleury-Souverain S, Goossens JF, Bonnabry P, Odou P, Evaluation of decontamination efficacy of cleaning solutions on stainless steel and glass surfaces contaminated by 10 antineoplastic agents. *Ann. Occup. Hyg.*, **57**, 456-469 (2013).

- 18) Simon N, Odou P, Decaudin B, Bonnabry P, Fleury-Souverain S, Efficiency of degradation or desorption methods in antineoplastic drug decontamination: A critical review. *J. Oncol. Pharm. Pract.*, **25**, 929-946 (2019).
- 19) Simon N, Odou P, Decaudin B, Bonnabry P, Fleury-Souverain S, Chemical decontamination of hazardous drugs: A comparison of solution performances. *Ann. Work Expo. Health*, **64**, 114-124 (2020).
- 20) Benvenuto JA, Connor TH, Monteith DK, Laidlaw JL, Adams SC, Matney TS, Theiss JC, Degradation and inactivation of antitumor drugs. *J. Pharm. Sci.*, **82**, 988-991 (1993).
- 21) Castegnaro M, De Méo M, Laget M, Michelon J, Garren L, Sportouch MH, Hansel S, Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents. 2: Six anthracyclines: idarubicin, doxorubicin, epirubicin, pirarubicin, aclarubicin, and daunorubicin. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **70**, 378-384 (1997).
- 22) Hansel S, Castegnaro M, Sportouch MH, De Méo M, Milhavet JC, Laget M, Duménil G, Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **69**, 109-114 (1997).
- 23) Lee SG, Ambados F, Tkaczuk M, Jankewicz G, Paclitaxel exposure and its effective decontamination. *J. Pharm. Pract. Res.*, **39**, 181-185 (2009).
- 24) Gohma H, Inoue Y, Asano M, Sugiura S, Testing the degradation effects of three reagents on various antineoplastic compounds. *J. Oncol. Pharm. Pract.*, **21**, 268-273 (2015).
- 25) Simon N, Guichard N, Odou P, Decaudin B, Bonnabry P, Fleury-Souverain S, Efficiency of four solutions in removing 23 conventional antineoplastic drugs from contaminated surfaces. *PLoS One*, **15**, e0235131 (2020).
- 26) Ferdes M, Zabava BS, Dinca MN, Parashiv G, Effect of ozone treatment on three bacterial strains of drinking water. *Eng. Rural Dev.*, **17**, 677-680 (2018).

- 27) Brodowska AJ, Nowak A, Śmigielski K, Ozone in the food industry: Principles of ozone treatment, mechanisms of action, and applications: An overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **58**, 2176-2201 (2018).
- 28) Lim S, Shi JL, von Gunten U, McCurry DL, Ozonation of organic compounds in water and wastewater: A critical review. *Water Res.* **213**, 118053 (2022).
- 29) Breidablik HJ, Lysebo DE, Johannessen L, Skare Å, Andersen JR, Kleiven OT, Ozonized water as an alternative to alcohol-based hand disinfection. *J. Hosp. Infect.*, **102**, 419-424 (2019).
- 30) Gardoni D, Vailati A, Canziani R, Decay of ozone in water: A review. *Ozone: Sci. Eng.*, **34**, 233-242 (2012).
- 31) Audran G, Marque SRA, Santelli M, Ozone, chemical reactivity and biological functions. *Tetrahedron*, **74**, 6221-6261 (2018).
- 32) Williams NT, Medication administration through enteral feeding tubes. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, **65**, 2347-2357 (2008).
- 33) Sestili M, Logrippo S, Cespi M, Bonacucina G, Ferrara L, Busco S, Grappasonni I, Palmieri GF, Ganzetti R, Blasi P, Potentially inappropriate prescribing of oral solid medications in elderly dysphagic patients. *Pharmaceutics*, **10**, 280 (2018).
- 34) Christmas C, Rogus-Pulia N, Swallowing disorders in the older population. *J. Am. Geriatr. Soc.*, **67**, 2643-2649 (2019).
- 35) Lau ETL, Steadman KJ, Cichero JAY, Nissen LM, Dosage form modification and oral drug delivery in older people. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **135**, 75-84 (2018).
- 36) Thong MY, Manrique YJ, Steadman KJ, Drug loss while crushing tablets: Comparison of 24 tablet crushing devices. *PLoS One*, **13**, e0193683 (2018).

- 37) Crul M, Breukels O, Ng S, Le Feber M, Kuijpers E, Smeets O, Limited health risks in performing drug reconstitution and handling tasks in pharmacies- results of an occupational risk assessment study. *J. Occup. Environ. Med.*, **65**, e204-e210 (2023).
- 38) Murahashi T, Arai M, Ogata K, Matsumoto M, Higuchi T, Occupational exposure of pharmacists to drugs during tablet crushing and its countermeasures. *Fundam. Toxicol. Sci.*, **9**, 85-93 (2022).
- 39) Kunieda K, Kurata N, Yoshimatsu Y, Ohno T, Shigematsu T, Fujishima I, A safe way to administer drugs through a nutrition tube-the simple suspension method. *Dysphagia*, **37**, 318-322 (2022).
- 40) Tanaka R, Eto D, Goto K, Ohchi Y, Yasuda N, Suzuki Y, Tatsuta R, Kitano T, Itoh H, Pharmacokinetic and adsorptive analyses of administration of oral voriconazole suspension via enteral feeding tube in intensive care unit patients. *Biol. Pharm. Bull.*, **44**, 737-741 (2021).
- 41) Morita TO, Yamaguchi A, Kimura S, Fujii H, Endo K, Izumi K, Saito S, Minami H, Stability of lenalidomide suspension after preparation by a simple suspension method for enteral tube administration. *J. Oncol. Pharm. Pract.*, **22**, 579-583 (2016).
- 42) Masaoka Y, Kawasaki Y, Kikuoka R, Ogawa A, Esumi S, Wada Y, Ushio S, Kitamura Y, Sendo T, Development of an appropriate simple suspension method for valganciclovir medication. *J. Pharm. Health Care Sci.*, **6**,16 (2020).
- 43) Kang SJ, Cho YS, Lee TH, Kim SE, Ryu HS, Kim JW, Park SY, Lee YJ, Shin JE, Constipation Research Group of the Korean Society of Neurogastroenterology and Motility, Medical management of constipation in elderly patients: Systematic review. *J. Neurogastroenterol. Motil.*, **27**, 495-512 (2021).
- 44) Mori H, Tack J, Suzuki H, Magnesium oxide in constipation. *Nutrients*, **13**, 421 (2021).

- 45) Mori H, Suzuki H, Hirai Y, Okuzawa A, Kayashima A, Kubosawa Y, Kinoshita S, Fujimoto A, Nakazato Y, Nishizawa T, Kikuchi M, Clinical features of hypermagnesemia in patients with functional constipation taking daily magnesium oxide. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **65**, 76-81 (2019).
- 46) 厚生労働省, 2022 (令和 4) 年 国民生活基礎調査の概要.
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa22/dl/14.pdf>
- 47) Ogawa R, Echizen H, Clinically significant drug interactions with antacids: an update. *Drugs*, **71**, 1839-1864 (2011).
- 48) Turel I, Sonc A, Zupancic M, Sepčić K, Turk T, Biological activity of some magnesium (II) complexes of quinolones. *Met. Based Drugs*, **7**, 101-104 (2000).
- 49) Berthon G, Brion M, Lambs L, Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. 2. Potentiometric study of magnesium complexes with tetracycline, oxytetracycline, doxycycline, and minocycline, and discussion of their possible influence on the bioavailability of these antibiotics in blood plasma. *J. Inorg. Biochem.*, **19**, 1-18 (1983).
- 50) Omotani H, Yasuda M, Ishii R, Ikarashi T, Fukuuchi T, Yamaoka N, Mawatari K, Kaneko K, Nakagomi K, Analysis of l-DOPA-derived melanin and a novel degradation product formed under alkaline conditions. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **125**, 22-26 (2016).
- 51) Shimizu S, Yuzuhara A, Yano K, Kitagawa K, Iida J, Ikarashi N, Ito K, Ochiai W, Orii T, Sugiyama K, Efficacy of low-dose aspirin therapy: Stability of aspirin suspended together with alkaline agents by the simple suspension method. *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **36**, 31-36 (2010).
- 52) Suryani N, Sugiyama E, Kurata N, Sato H, Stability of ester prodrugs with magnesium oxide using the simple suspension method. *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **39**, 375-380 (2013).

- 53) Yuzuki S, Minegaki T, Hakui R, Fujii N, Hamada M, Wakabayashi M, Bando K, Miyanishi R, Momii K, Tsujimoto M, Nishiguchi K, Drug incompatibility of amlodipine under basic conditions in a simple suspension method. *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **40**, 252-257 (2014).
- 54) Takano Y, Kabe H, Mizoi K, Hakoda K, Mineno T, Yano K, Ogihara T, Effect of magnesium oxide on the stability of ACE inhibitors in simple suspension method. *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **47**, 208-216 (2021).
- 55) Al-Baarri AN, Legowo AM, Abduh SBM, Mawarid AA, Farizha KM, Silvia M, Production of ozone and the simple detection using potassium iodide titration method. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, **292**, 012062 (2019).
- 56) Chen G, Svirskis D, Wen J, Development and validation of a stability indicating isocratic HPLC method for gemcitabine with application to drug release from poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles and enzymatic degradation studies. *J. Pharm. Pharmacol.*, **67**, 1528-1536 (2015).
- 57) de Mattos AC, Khalil NM, Mainardes RM, Development and validation of an HPLC method for the determination of fluorouracil in polymeric nanoparticles. *Braz. J. Pharm. Sci.*, **49**, 117-126 (2013).
- 58) Banu T, Varanasi MB, Khan MMA, Sharma JVC, Teja BB, Kumar VS, Habibuddin M, Validated reverse phase HPLC method for the determination of pemetrexed disodium in pharmaceutical dosage forms. *Orient. J. Chem.*, **26**, 1325-1332 (2010).
- 59) Ficarra R, Calabrò ML, Cutroneo P, Tommasini S, Melardi S, Semreen M, Furlanetto S, Ficarra P, Altavilla G, Validation of a LC method for the analysis of oxaliplatin in a pharmaceutical formulation using an experimental design. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **29**, 1097-1103 (2002).
- 60) Murali Balalam V, Venkateswara Rao J, Ramakrishna S, Sankar Ganesh G, Balamurali Krishna T, Validated reverse phase HPLC method for the determination of irinotecan in pharmaceutical dosage forms. *E-J. Chem.*, **4**, 128-136 (2007).

- 61) Rodrigues AS, Lopes AR, Leão A, Couceiro A, Ribeiro ABS, Ramos F, Noronha da Silveira MI, Resende de Oliveira C, Development of an analytical methodology for simultaneous determination of vincristine and doxorubicin in pharmaceutical preparations for oncology by HPLC-UV. *J. Chromatogr. Sci.*, **47**, 387-391 (2009).
- 62) Castagne V, Habert H, Abbara C, Rudant E, Bonhomme-Faivre L, Cytotoxics compounded sterile preparation control by HPLC during a 16-month assessment in a French university hospital: importance of the mixing bags step. *J. Oncol. Pharm. Pract.*, **17**, 191-196 (2011).
- 63) Yonemoto H, Ogino S, Nakashima MN, Wada M, Nakashima K, Determination of paclitaxel in human and rat blood samples after administration of low dose paclitaxel by HPLC-UV detection. *Biomed. Chromatogr.*, **21**, 310-317 (2007).
- 64) McKay RT, How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabonomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution. *Concepts Magn. Reson. Part A*, **38A**, 197-220 (2011).
- 65) Maron DM, Ames BN, Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173-215 (1983).
- 66) Hatae N, Satoh R, Chiba H, Osaki T, Nishiyama T, Ishikura M, Abe T, Hibimo S, Choshi T, Okada C, Toyota E, *N*-Substituted calothrixin B derivatives inhibited the proliferation of HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Med. Chem. Res.*, **23**, 4956-4961 (2014).
- 67) Matsui M, Inoue T, Shibata K, Muramatsu H, Ozonolysis of pyrimidine nucleosides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 296-297 (1990).
- 68) Chen S, Blaney L, Chen P, Deng S, Hopanna M, Bao Y, Yu G, Ozonation of 5-fluorouracil anticancer drug and its prodrug capecitabine: Reaction kinetics, oxidation mechanisms, and residual toxicity. *Front. Environ. Sci. Eng.*, **13**, 59 (2019).

- 69) Blaney L, Lawler DF, Katz LE, Transformation kinetics of cyclophosphamide and ifosfamide by ozone and hydroxyl radicals using continuous oxidant addition reactors. *J. Hazard Mater*, **364**, 752-761 (2019).
- 70) Ferre-Aracil J, Valcárcel Y, Negreira N, de Alda ML, Barceló D, Cardona SC, Navarro-Laboulais J, Ozonation of hospital raw wastewaters for cytostatic compounds removal. Kinetic modelling and economic assessment of the process. *Sci. Total Environ.*, **556**, 70-79 (2016).
- 71) Yajima N, Kondo K, Morita K, Reverse mutation tests in *Salmonella typhimurium* and chromosomal aberration tests in mammalian cells in culture on fluorinated pyrimidine derivatives. *Mutat. Res.*, **88**, 241-254 (1981).
- 72) Benedict WF, Baker MS, Haroun L, Choi E, Ames BN, Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the *Salmonella*/microsome test. *Cancer Res.*, **37**, 2209-2213 (1977).
- 73) Drugs. com, FDA professional drug information.
<https://www.drugs.com/pro/oxaliplatin.html>
<https://www.drugs.com/pro/pemetrexed.html>
- 74) Stucki S, Theis G, Kötz R, Devantay H, Christen HJ, *In situ* production of ozone in water using a membral electrolyzer. *J. Electrochem. Soc.*, **132**, 367-371 (1985).
- 75) オゾンハンドブック [改訂第2版]. 日本オゾン協会 (2022).
- 76) U.S. Environmental Protection Agency (2015), Setting and reviewing standards to control ozone pollution. <https://www.epa.gov/criteria-air-pollutants/naaqs-table>
- 77) 許容濃度等の勧告 (2023年度). *産衛誌*, **65**, 268-300 (2023).
- 78) 鈴木亮輔, 気体オゾンによる金属・半導体材料表面の高酸化状態形成. *応用物理*, **74**, 37-41 (2005).

- 79) Palamini M, Floutier M, Gagné S, Caron N, Bussièrès JF, Evaluation of decontamination efficacy of four antineoplastics (ifosfamide, 5-fluorouracil, irinotecan, and methotrexate) after deliberate contamination. *J. Occup. Environ. Hyg.*, **18**, 43-50 (2021).
- 80) Telleria N, García N, Grisaleña J, Algaba N, Bergareche E, Tamés MJ, Cajaraville G, Evaluation of the efficacy of a self-cleaning automated compounding system for the decontamination of cytotoxic drugs. *J. Oncol. Pharm. Pract.*, **27**, 1343-1353 (2021).
- 81) Böhlandt A, Groeneveld S, Fischer E, Schierl R, Cleaning efficiencies of three cleaning agents on four different surfaces after contamination by gemcitabine and 5-fluorouracile. *J. Occup. Environ. Hyg.*, **12**, 384-392 (2015).
- 82) Miura T, Muraoka S, Fujimoto Y, Inactivation of creatine kinase by Adriamycin during interaction with horseradish peroxidase. *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 95-99 (2000).
- 83) Tsukamoto A, Ishiwata S, Kajimoto A, Murata R, Kitano R, Inoue T, Kotake T, Application of ozone gas for decontamination of nucleoside anticancer drugs. *J. Pharm. Health Care Sci.*, **2**, 26 (2016).
- 84) Choraku T, Ishiwata S, Kitano R, Fujimoto M, Nagai N, Yamamoto R, Okazaki T, Endo S, Inoue T, Kotake T, Decomposition of anthracycline anticancer drugs by ozone gas as a decontaminant. *Bull. Med. Hyg. Ozone Res.*, **25**, 90-97 (2018).
- 85) Garcia-Costa AL, Gouveia TIA, Pereira MFR, Silva AMT, Alves A, Madeira LM, Santos MSF, Ozonation of cytostatic drugs in aqueous phase. *Sci. Total Environ.*, **795**, 148855 (2021).
- 86) Česen M, Kosjek T, Laimou-Geraniou M, Kompore B, Širok B, Lambropoulou D, Heath E, Occurrence of cyclophosphamide and ifosfamide in aqueous environment and their removal by biological and abiotic wastewater treatment processes. *Sci. Total Environ.*, **527-528**, 465-473 (2015).

- 87) Castegnaro M, Adams J, Armour MA et al. editors, Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: Some antineoplastic agents. *In IARC Scientific Publication No.73*. Oxford: IARC, Oxford University Press, ISBN 978-92-832-2201-9 (1985).
- 88) Hungin AP, Chronic constipation in adults: The primary care approach. *Dig. Dis.*, **40**, 142-146 (2022).
- 89) Rossi M, Fabris E, Barbisan D, Massa L, Sinagra G, Lipid-lowering drug therapy: Critical approach for implementation in clinical practice. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, **22**, 141-155 (2022).
- 90) Muscoli S, Ifrim M, Russo M, Candido F, Sanseviero A, Milite M, Di Luozzo M, Marchei M, Sangiorgi GM, Current options and future perspectives in the treatment of dyslipidemia. *J. Clin. Med.*, **11**, 4716 (2022).
- 91) 倉田なおみ, 石田志朗, 簡易懸濁法マニュアル 第2版. じほう (2021).
- 92) Kublin E, Malanowicz E, Kaczmarska-Graczyk B, Czerwińska K, Wyszomirska E, Mazurek AP, Development of chromatographic method for determination of drugs reducing cholesterol level-statins and ezetimibe. *Acta Pol. Pharm.*, **72**, 429-437 (2015).
- 93) Álvarez-Lueje A, Valenzuela C, Squella JA, Núñez-Vergara LJ, Stability study of simvastatin under hydrolytic conditions assessed by liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, **88**, 1631-1636 (2005).
- 94) Sánta Z, Kóti J, Szóke K, Vukics K, Szántay C Jr, Structure of the major degradant of ezetimibe. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **58**, 125-129 (2012).
- 95) Bařová J, Imramovský A, Hájíček J, Hejtmánková L, Hanusek J, Kinetics and mechanism of the base-catalyzed rearrangement and hydrolysis of ezetimibe. *J. Pharm. Sci.*, **103**, 2240-2247 (2014).
- 96) Khedr A, Stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay of atorvastatin with fluorescence detection. *J. AOAC Int.*, **90**, 1547-1553 (2007).

- 97) Önal A, Sagirli O, Development of a selective LC method for the determination of pravastatin sodium. *Chromatographia*, **64**, 157-162 (2006).
- 98) Machairas G, Panderi I, Geballa-Koukoula A, Rozou S, Antonopoulos N, Charitos C, Vonaparti A, Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography method for the quantitation of impurities in fixed-dose combination tablets containing rosuvastatin and metformin. *Talanta*, **183**, 131-141 (2018).
- 99) Goel A, Baboota S, Sahni JK, Srinivas KS, Gupta RS, Gupta A, Semwal VP, Ali J, Development and validation of stability-indicating assay method by UPLC for a fixed dose combination of atorvastatin and ezetimibe. *J. Chromatogr. Sci.*, **51**, 222-228 (2013).
- 100) Yano K, Takezawa T, Mochizuki T, Ikarashi N, Ito, K, Orii T, Kurata N, Sugiyama K, Stability of drugs when prepared for tube administration by simple suspension method. *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **32**, 1094-1099 (2006).
- 101) Martin PD, Schneck DW, Dane AL, Warwick MJ, The effect of a combination antacid preparation containing aluminium hydroxide and magnesium hydroxide on rosuvastatin pharmacokinetics. *Curr. Med. Res. Opin.*, **24**, 1231-1235 (2008).
- 102) Yang DJ, Hwang LS, Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-Erh tea. *J. Chromatogr. A*, **1119**, 277-284 (2006).
- 103) Geboers S, Stappaerts J, Tack J, Annaert P, Augustijns P, In vitro and in vivo investigation of the gastrointestinal behavior of simvastatin. *Int. J. Pharm.*, **510**, 296-303 (2016).
- 104) Hoffmann M, Nowosielski M, DFT study on hydroxy acid-lactone interconversion of statins: the case of atorvastatin. *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 3527-3531 (2008).

- 105) 磯部健一, 加齢に伴う免疫機能の変化. *医学のあゆみ*, **269**, 238-243 (2019).
- 106) 国立研究開発法人国立国際医療センターAMR 臨床リファレンスセンター, 全国抗菌薬販売量サーベイランス.
<https://amrerc.ncgm.go.jp/surveillance/020/20190902163931.html>
- 107) Injac R, Kočevár N, Štrukelj B, Optimized method for determination of amoxicillin, ampicillin, sulfamethoxazole, and sulfacetamide in animal feed by micellar electrokinetic capillary chromatography and comparison with high-performance liquid chromatography. *Croat. Chem. Acta*, **82**, 685-694 (2009).
- 108) Pérez-Parada A, Agüera A, Gómez-Ramos MM, García-Reyes JF, Heinzen H, Fernández-Alba AR, Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: identification of its main transformation products by liquid chromatography/electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **25**, 731-742 (2011).
- 109) Iwata H, Tanaka R, Ishiguro M, Structures of the alkaline hydrolysis products of penem antibiotic, SUN5555. *J. Antibiot.*, **43**, 901-903 (1990).
- 110) Trovó AG, Nogueira RFP, Agüera A, Fernandez-Alba AR, Malato S, Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton process - Chemical and toxicological assessment. *Water Res.*, **45**, 1394-1402 (2011).
- 111) Lamm A, Gozlan I, Rotstein A, Avisar D, Detection of amoxicillin-diketopiperazine-2', 5' in wastewater samples. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.*, **44**, 1512-1517 (2009).
- 112) Haginaka J, Wakai J, Epimerization of amoxicillin piperazine-2, 5-dione in acidic solutions. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 2239-2242 (1986).

- 113) Gallo MBC, Nascimento DD, Nunes NM, Sousa FFM, Boniatti J, Aguiar JLN, Medeiros JJS, Esteves AL, Guerra GMS, Ferreira LEM, Regis LGI, Seiceira RC, Moncorvo FMSU, Chaves MHC, Forced degradation study and development of a stability-indicating method for amoxicillin capsules according to ANVISA guidelines. *J. Braz. Chem. Soc.*, **32**, 2195-2205 (2021).
- 114) Raju ChBVN, Sharma HK, Rao CS, Rao GN, RP-HPLC method for analysis of related substances in amoxicillin drug substance. *Acta Chromatographica*, **21**, 57-70 (2009).
- 115) Tippa DMR, Singh N, Development and validation of stability indicating HPLC method for simultaneous estimation of amoxicillin and clavulanic acid in injection. *Am. J. Anal. Chem.*, **1**, 95-101 (2010).
- 116) Freitas A, Barbosa J, Ramos F, Determination of amoxicillin stability in chicken meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Anal. Methods*, **5**, 471-479 (2012).

補足資料

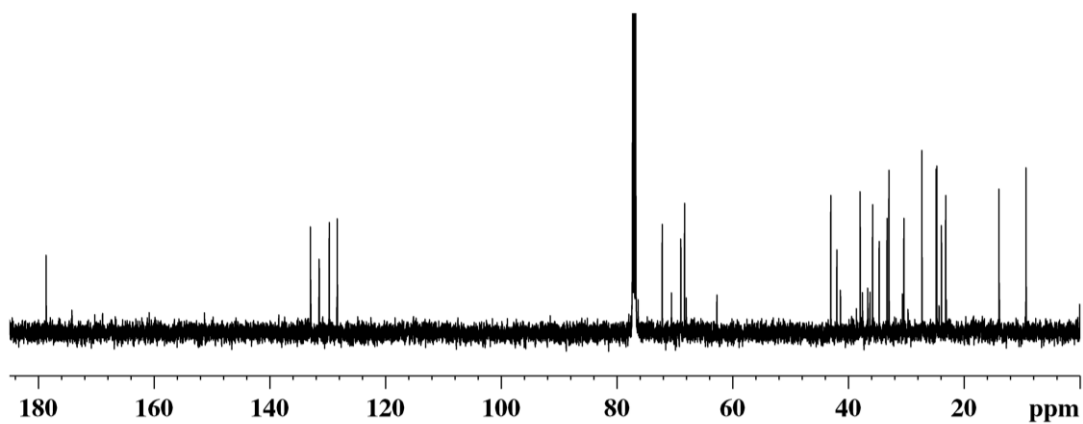


Fig. S1. ^1H -decoupled ^{13}C NMR spectrum of the chloroform extract from the co-suspension of SS and MG.
solvent, CDCl_3 .

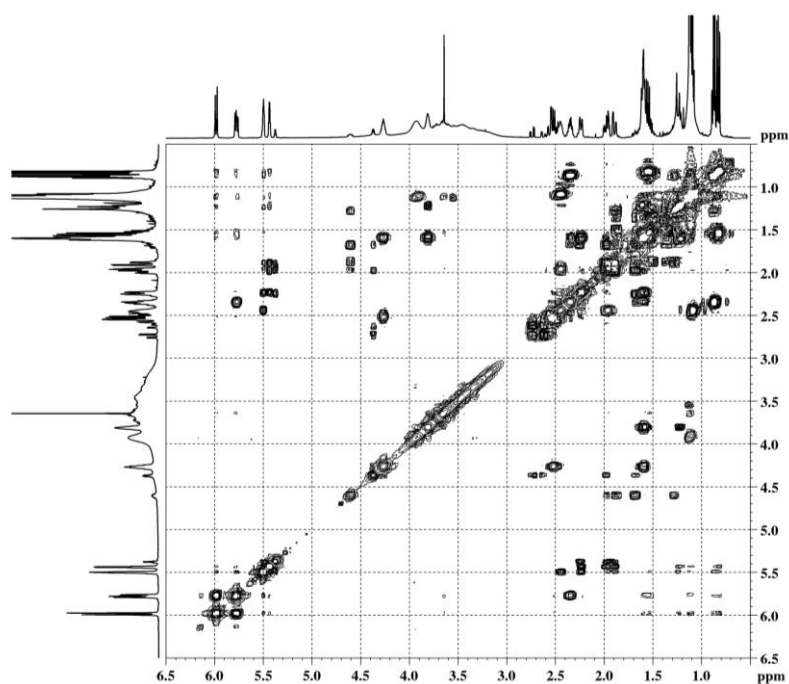


Fig. S2. COSY spectrum of the chloroform extract from the co-suspension of SS and MG.
solvent, CDCl_3 .

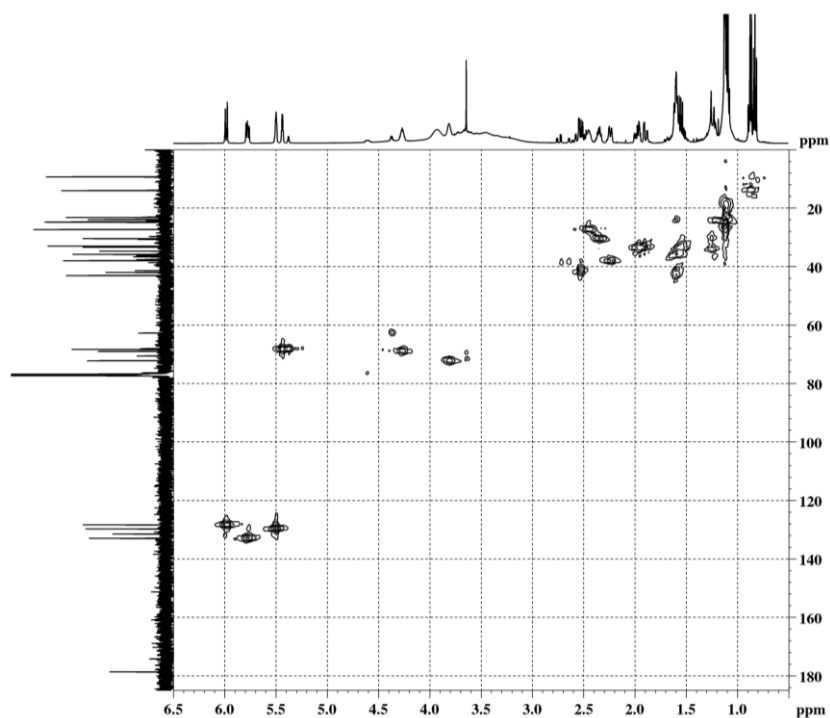


Fig. S3. HMQC spectrum of the chloroform extract from the co-suspension of SS and MG. solvent, CDCl_3 .

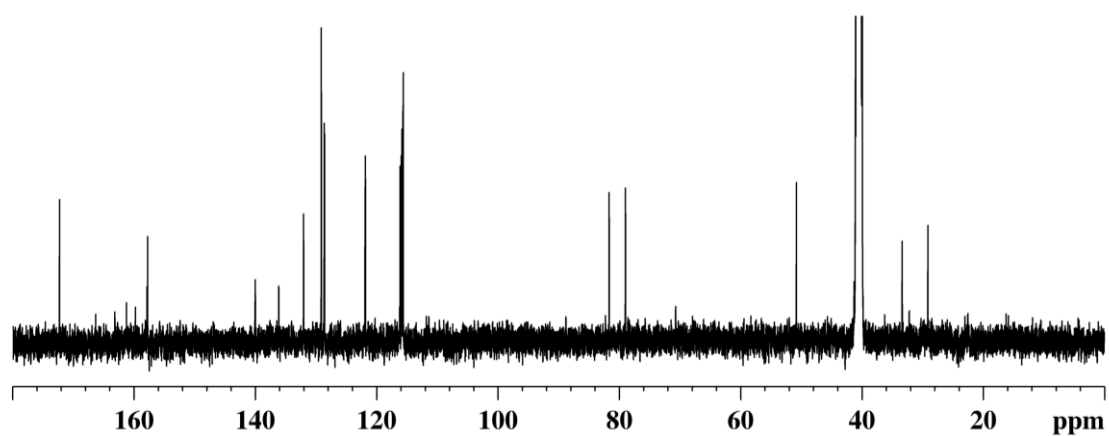


Fig. S4. ^1H -decoupled ^{13}C NMR spectrum of the ezetimibe degradation product with a tetrahydropyran skeleton. solvent, $\text{DMSO}-d_6$.

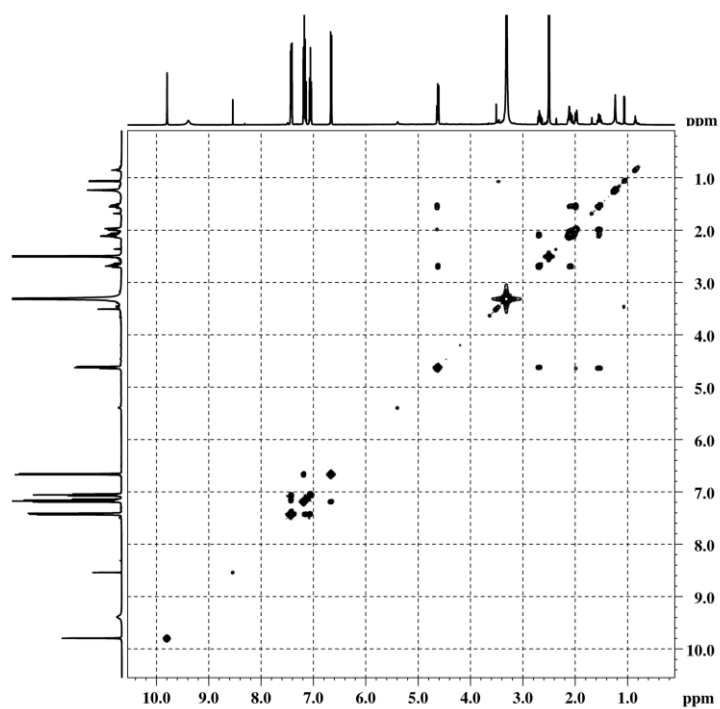


Fig. S5. COSY spectrum of the ezetimibe degradation product with a tetrahydropyran skeleton.
solvent, DMSO-*d*₆.

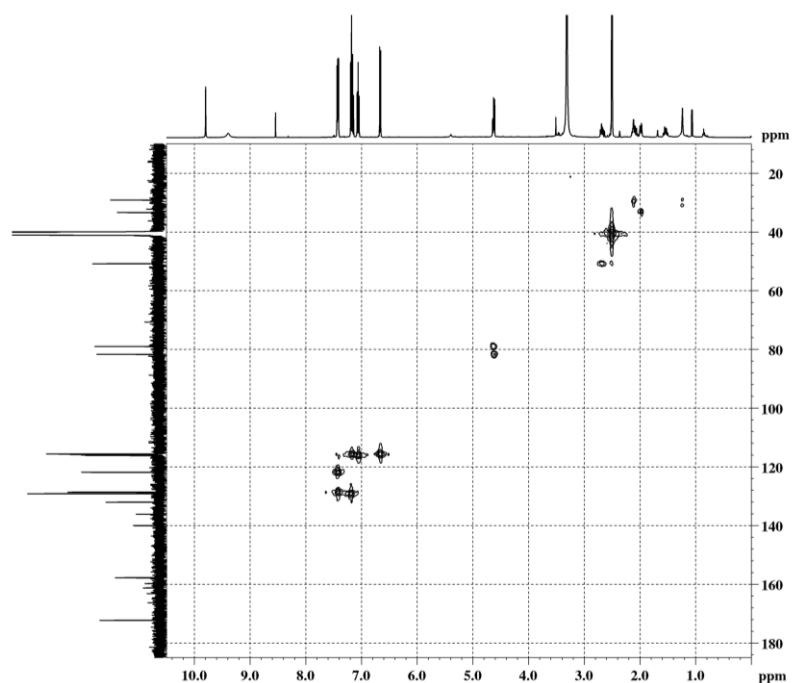


Fig. S6. HMQC spectrum of the ezetimibe degradation product with a tetrahydropyran skeleton.
solvent, DMSO-*d*₆.

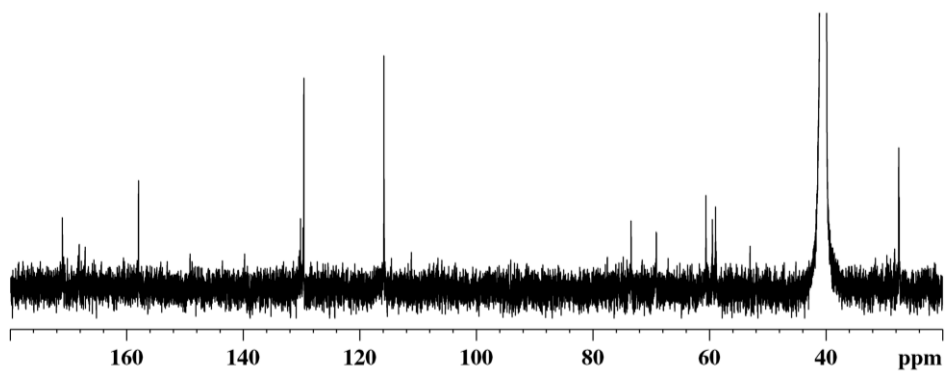


Fig. S7. ^1H -decoupled ^{13}C NMR spectrum of D3.
solvent, $\text{DMSO-}d_6$.

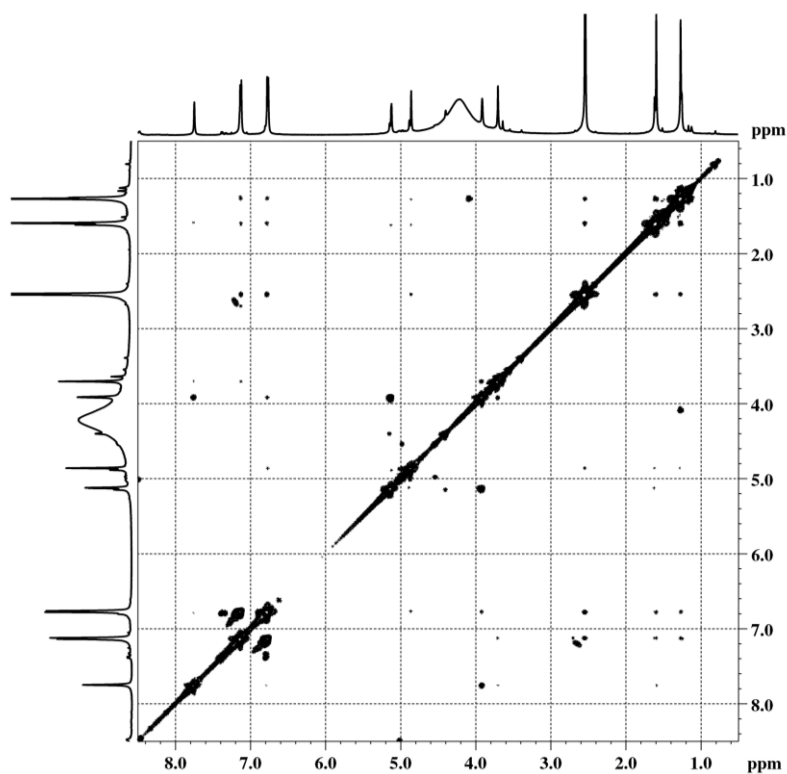


Fig. S8. COSY spectrum of D3.
solvent, $\text{DMSO-}d_6$.

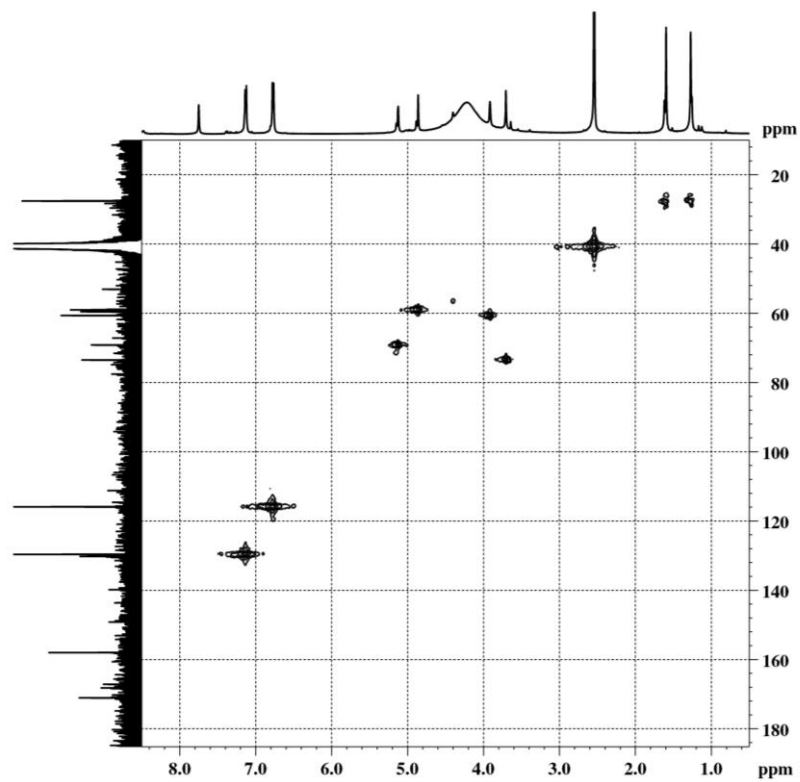


Fig. S9. HMQC spectrum of D3.
solvent, $\text{DMSO-}d_6$.

略語一覧

本論文では，以下の略語を用いた．

AMX	AMOXICILLIN CAPSULES 250 mg “TOWA”
AS	ATORVASTATIN Tablets 5 mg [SAWAI]
CDDP	CISPLATIN for I.V. infusion 50 mg 「MARUKO」
CFPN	CEFCAPENE PIVOXIL HYDROCHLORIDE Tablets 100 mg [SW]
COSY	^1H - ^1H correlation spectroscopy
CP	Endoxan [®] for Injection
DMSO	ジメチルスルホキシド
DTX	Docetaxel I.V. infusion 20 mg/1 mL 「EE」
DXR	Doxorubicin Hydrochloride for Injection 50 mg 「NK」
EZ	EZETIMIBE TABLETS 10 mg 「DSEP」
E^0	標準酸化還元電位
GEM	Gemcitabine for I.V. infusion 200 mg 「Yakult」
HCT-116	ヒト結腸腺がん細胞
HL-60	ヒト前骨髄性白血病細胞
HMQC	heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
IFO	Ifomide [®] for Injection
IRI	Irinotecan Hydrochloride I.V. Infusion 40 mg 「TAIHO」
LOD	検出限界
LOQ	定量限界
MG	Magmitt [®] Tablets 330

MS/MS	タンデム質量スペクトル
NMR	核磁気共鳴分光法
OXA	ELPLAT I.V. INFUSION SOLUTION 100 mg
PEM	Pemetrexed Solution for I.V. Infusion 100 mg 「NK」
PTX	Paclitaxel I.V. Infusion 100 mg/16.7 mL Hospira
PS	PRAVASTATIN Na 5 mg
RS	ROSUVASTATIN TABLETS 2.5 mg 「DSEP」
S.D.	標準偏差
SS	Simvastatin Tab. 5 mg “TAKEDA TEVA”
TFA	トリフルオロ酢酸
TMS	テトラメチルシラン
TSP	3-(トリメチルシリル) プロピオン酸ナトリウム-2,2,3,3- <i>d</i> ₄
5-FU	5-FU Injection 1000 mg