CarboplatinはCisplatinへ変化する？ —各種水溶液中での経時変化—

藤本亜弓¹, 加藤隆児¹, 佐藤卓史^{2,3}, 岡田龍二¹, 吉開晶一¹, 遠藤幹子¹, 高橋幸大¹
今野秀樹¹, 井尻好雄^{*1}, 三野芳紀³, 千熊正彦³, 田中一彦^{1,4}, 林 哲也¹
大阪薬科大学 循環病態治療学研究室¹, 基礎薬学教育研究センター², 薬品分析化学研究室³, 白鷺病院⁴

Does Carboplatin Change to Cisplatin? — Chronological Change in Various Aqueous Solutions —

Ayumi Fujimoto¹, Ryuji Kato¹, Takaji Sato^{2,3}, Ryuji Okada¹, Shoichi Yoshikai¹,
Mikiko Endo¹, Kodai Takahashi¹, Hideki Imano¹, Yoshio Ijiri^{*1}, Mino Yoshiki³,
Masahiko Chikuma³, Kazuhiko Tanaka^{1,4} and Tetsuya Hayashi¹

Department of Cardiovascular Pharmacotherapy and Toxicology¹,

Department of Education and Research Center for Fundamental Pharmaceutical Sciences²,

Department of Bio-Analytical Chemistry³, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Shirasagi Hospital⁴

[Received February 27, 2018]
[Accepted July 4, 2018]

Although it was reported that carboplatin, a second-generation platinum agent, exhibits an anti-cancer effect after the structure is changed from carboplatin to cisplatin, how this change takes place remains unclear. In this study, the stability of carboplatin to pH and Cl⁻ concentration was examined by HPLC using π NAP column. In the absence of sodium chloride, carboplatin did not change to cisplatin. However, in the presence of sodium chloride at pH 3.0 and 6.0, carboplatin changed to cisplatin after 8 hr and carboplatin changed to 0.33 mmol cisplatin at 24 hr in the presence of sodium chloride at pH 3.0. The result of this study shows that when carboplatin was mixed with an infusion solution of inorganic salts including chloride, the solution should be infused within 8 hr.

Key words — carboplatin, cisplatin, stability, pH, sodium chloride

緒 言

カルボプラチン（CBDCA）は第二世代の白金製剤であり、第一世代の白金製剤であるシスプラチン（CDDP）の重篤な副作用である腎障害や嘔気・嘔吐の軽減を目的として開発された（パラプラチン®注射液医薬品インタビューフォーム、 Bristol・マイヤーズ スクイブ株式会社, 2018年1月）。CBDCAの作用機序は、CDDPとほぼ同様と考えられている。Knoxらは、1,1-シクロブタンジカルボン酸配位子の一方がOH₂に変換される中間体（アコ体）を形成し、その後、さらにOH₂体はDNAに置換される。もう一方の配位子

も、同様にアコ体を介してDNAに置換される、と報告している。¹⁾ 一方、CBDCA調整時において、CBDCAの添付文書には、適用上の注意として生理食塩液等の無機塩類（NaCl, KCl, CaCl₂等）を含有する輸液に混和するときは、8時間以内に投与を終了することと記載されているが、Bristol・マイヤーズ スクイブ(株)インタビューフォームには、生食、5%ブドウ糖液で8時間まではCBDCAの残存量の低下は認めない、となっている。現在、CBDCAの水溶液中における安定性は高速液体クロマトグラフィー（high performance liquid chromatography: HPLC）により測定されたその残存量のみの判断である。

*〒569-1094 大阪府高槻市奈佐原4-20-1

そこで、2005年に市場に参入され、CDDPの検出力が高くなった π NAP columnを用いたHPLC法により、²⁾ CBDCAが塩化物イオンによりCDDPに変化するか否かを検討した。

方 法

1. 試料

CDDP (cis-Diammine-dichloroplatinum (II)), CBDCA (cis-Diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato) platinum (II))はWako Pure Chemical Industries, Ltd (Osaka, Japan)から購入したものを使用した。過塩素酸 (HClO₄, Wako Pure Chemical Industries, Ltd) および塩化ナトリウム (NaCl, Nacalai Tesque, Inc, Kyoto, Japan)を使用した。注射用水「フソー」®, 生理食塩液「フソー」®, 5%ブドウ糖溶液 (Tz, 5%ブドウ糖静注「フソー」®, Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd, Osaka, Japan), 7%炭酸水素ナトリウム溶液 (7%メイロン® 静注「大塚」, Otsuka Pharmaceutical Co, Ltd, Tokyo, Japan)を使用した。その他の試薬および溶媒は、市販のHPLC用および特級試薬を使用した。

2. 薬物の調製

(1) CBDCA 溶液および試薬の調製

4 mM (1.48 mg/mL) CBDCAは蒸留水に溶解し、CBDCA溶液を調製した。過塩素酸を蒸留水に溶解し、26 mM (pH 3)に調製したものをpH添加液とし、スチロールケースで遮光保存した。塩化ナトリウムを蒸留水に溶解し、Cl⁻ 154 mEqに調製したものをCl⁻添加液とした。塩化ナトリウムを154 mMかつ過塩素酸を26 mMに調製したものをpH + Cl⁻添加液とし、スチロールケースで遮光保存した。

3. CBDCA・CDDP濃度測定方法

(1) 装置および測定条件

HPLCによる測定は以下の条件で行った。

ポンプ：LC-10ADVP (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)

検出器：SPD-10AVP (Shimadzu Corporation)

カラム：COSMOSIL π NAP Packed Column 4.6 mm ID $\times$ 250 mm (Nacalai Tesque, Inc)

流 速：1 mL/min

移動相：100 mM 過塩素酸ナトリウム：アセトニトリル：100 mM 過塩素酸 (290：10：3 (v/v/v))

カラム温度：37℃

検出波長：225 nm

注入量：20 μ L

(2) 移動相の調製

100 mM 過塩素酸ナトリウム水溶液、HPLC用アセトニトリル、および100 mM 過塩素酸水溶液を混合し (100 mM 過塩素酸ナトリウム / アセトニトリル / 100 mM 過塩素酸 = 290/10/3), フィルター濾過後、脱気した。

(3) CBDCA および CDDP (Di-chloro 体) の検量線の作成

CBDCAは注射用水にて溶解し、濃度は0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mMの標準溶液を調製した。また、CDDPは生理食塩水にて溶解し、濃度は0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mMの標準溶液を調製した。これら標準溶液20 μ LをHPLCに注入した。各々の標準溶液において検出された薬物のピーク面積を求め、回帰分析を行い、検量線を作成した。

(4) CBDCA および CDDP (Di-chloro 体) の日内変動・日間変動、検出限界および検量線の算出

CBDCAは注射用水にて溶解し、濃度は0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mMの標準溶液を調製した。また、Di-chloro体は生理食塩水にて溶解し、濃度は0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 4.0 mMの標準溶液を調製した。これら標準溶液20 μ LをHPLCに注入した。各々の標準溶液において検出された薬物のピーク面積を求め、検量線を作成した。日内変動の検討では5回繰り返し測定し、日間変動の検討では5日間にわたり測定した。得られた測定値から平均値 (mean) および標準偏差 (standard deviation: SD) を算出し、変動係数 (coefficient of variation: CV) の計算を行った。

4. 配合変化用サンプルの調製

下記の溶液を作成し、それぞれの添加液の混合

直後を0時間とし、0, 1, 2, 4, 8, 12, 24時間後のCBDCAおよび生成物の濃度を測定した。

A群 CBDCA (pH 3.0): CBDCA (4 mM) を注射用水に溶解し、26 mM 過塩素酸溶液を添加。

B群 CBDCA (pH 3.0; Cl⁻ 154 mEq): CBDCA (4 mM) を注射用水に溶解し、26 mM 過塩素酸溶液と生理食塩液を添加。

C群 CBDCA (pH 5.8-6.0; Cl⁻ 154 mEq): CBDCA (4 mM) を生理食塩液に溶解。

D群 CBDCA (pH 6.0): CBDCA (4 mM) を注射用水に溶解。

E群 CBDCA (pH 3.5-6.5; 5% TZ): CBDCA (4 mM) を5%ブドウ糖溶液に溶解。

F群 CBDCA (pH 8.3-9.0; 7% maylon): CBDCA (4 mM) を7% 炭酸水素ナトリウム溶液に溶解。

結果・まとめ

1. ピークの同定

πNAP column を用いた場合のCDDP, CBDCA保持時間はそれぞれ3.2および3.0分であった(図1)。また、C18 column を用いた場合のCDDP, CBDCA保持時間はそれぞれ4.6および5.0分であった。ピークは各々完全に分離が認められた。

2. 検量線

CBDCAの検量線として、 $y = 3 \times 10^6 x + 22671$ ($r^2 = 0.999$) が得られた(測定範囲: 0.1-4.0 mM)。また、CDDPの検量線としては $y = 1 \times 10^6 x + 70418$ ($r^2 = 0.998$) が得られた(測定範囲: 0.01-4.0 mM)。共に測定濃度範囲内で線形性が認められた。

3. 再現性

日内変動の検討として、CBDCA, CDDP標準溶液をそれぞれ1日に5回(溶液調整後1, 2, 3, 4, 5時間後)測定し、その結果から変動係数(CV)を算出した。CBDCA 1 mM 溶液(CV: 8.2%)以外の各CBDCAおよびCDDP標準溶液のCVは5%未満であった(表1A, 表2A)。また、日間変動

図1 πNAP column を用いた際のCDDP, CBDCAクロマトグラム

表1 HPLC法によるカルボプラチン測定における日内および日間変動

A 日内変動

時間 濃度 (mM)	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	平均	標準偏差	変動係数
4	11,075,712	11,574,360	11,754,343	11,831,849	11,682,500	11,583,753	299,415	2.59
2	5,540,643	5,530,254	5,540,800	5,789,838	5,582,875	5,596,882	109,744.6	1.96
1	2,465,864	3,002,763	2,595,204	2,541,455	2,518,248	2,624,707	216,386.4	8.24
0.5	1,589,908	1,597,139	1,608,563	1,544,909	1,638,501	1,595,804	33,958.33	2.13
0.1	342,281	376,085	350,787	342,490	346,457	351,620	14,110.82	4.01

B 日間変動

日数 濃度 (mM)	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目	平均	標準偏差	変動係数
4	11,075,712	11,305,030	11,568,682	11,324,623	12,776,217	11,610,053	674,848	5.81
2	5,540,643	5,311,493	5,642,670	5,651,912	5,697,238	5,568,791	154,807	2.78
1	2,465,864	2,517,391	2,707,159	2,518,502	2,537,865	2,549,356	92,166	3.62
0.5	1,589,908	1,577,641	1,640,713	1,626,743	1,538,561	1,594,713	40,649	2.55
0.1	342,281	354,586	362,922	364,104	363,454	357,469	9,335	2.61

数値: カウント数. HPLC: high performance liquid chromatography.

表2 HPLC 法によるシスプラチン測定における日内および日間変動

A 日内変動

時間 濃度 (mM)	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	平均	標準偏差	変動係数
4	4,935,577	5,119,140	5,083,874	4,838,728	5,073,628	5,010,189	118,628	2.38
2	2,742,389	2,722,355	2,781,369	2,736,536	2,570,727	2,710,675	81,231	3.00
1	1,407,400	1,436,592	1,378,612	1,419,346	1,446,666	1,417,723	26,611	1.88
0.5	709,233	712,174	698,883	733,884	719,718	715,778	13,035	1.82
0.1	144,601	144,232	146,173	152,091	144,444	146,308	3,323	2.27
0.05	73,422	72,220	75,005	71,807	73,558	73,202	1,259	1.72
0.01	15,580	16,101	15,744	14,664	16,432	15,704	668	4.26

B 日間変動

日数 濃度 (mM)	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目	平均	標準偏差	変動係数
4	4,935,577	5,509,604	4,779,502	5,074,232	5,237,144	5,107,212	281,399	5.51
2	2,742,389	2,916,711	2,839,006	2,692,108	2,752,640	2,788,571	89,012	3.19
1	1,407,400	1,498,540	1,450,055	1,410,365	1,458,800	1,445,032	37,736	2.61
0.5	709,233	729,589	750,311	723,220	736,998	729,870	15,321	2.10
0.1	144,601	158,246	150,676	147,827	144,907	149,251	5,601	3.75
0.05	73,422	79,432	79,582	74,263	77,169	76,774	2,857	3.72
0.01	15,580	16,941	16,050	15,905	15,667	16,029	543	3.39

数値：カウント数. HPLC: high performance liquid chromatography.

表3 各群における 24 時間後のカルボプラチン (CBDCA) 量, シスプラチン (CDDP) 量, CBDCA 残存率

	CBDCA 量 (mmol)			CBDCA 残存率 (%)		CDDP 量 (mmol)	
	0 h	8 h	24 h	8 h	24 h	8 h	24 h
DW (pH 3.0) 群	4.29	4.27	4.19	99.5	97.7	0	0
PS (pH 3.0) 群	3.55	3.41	3.07	96.1	86.5	0.056	0.33
PS (pH 5.8-6.0) 群	4.16	4.13	4.29	99.3	103	0.004	0.04
DW (pH 6.0) 群	4.38	4.38	4.54	100	104	0	0
5% Tz (pH 3.5-6.5) 群	3.99	4.03	4.04	101	101	0	0
7% meylon (pH 8.3-9.0) 群	4.29	3.93	3.41	91.6	79.5	0	0

DW: 注射用水, PS: 生理食塩液, Tz: ブドウ糖溶液, meylon: メイロン® 静注「大塚」(炭酸水素ナトリウム液). CBDCA は 4 mM に調整. Data are shown as mean (n = 3).

の検討として, CDDP 標準溶液を 5 日間測定し, その結果から CV を算出した. CBDCA 4 mM (CV; 5.8%), CDDP 4 mM (CV; 5.5%) 以外の CBDCA および CDDP 標準溶液の CV 値は 5% 未満であった (表 1B, 表 2B). 本研究で用いた測定法の測定範囲は, 0.1-4.0 mM および 0.01-4.0 mM であった.

4. CBDCA の各溶液の経時変化

本研究において A~F の各溶液における安定性 (配合変化) を 0 時間から 24 時間, 経時的に測定した. その結果を CBDCA 量, CBDCA 残存率, CDDP 量として表 3 に示した. Cl⁻ 非存在下の場合, CDDP のピークは観測されなかったが, Cl⁻ 154 mEq

存在下, pH 6.0 では 8 時間後では 0.004 mmol, 24 時間後では 0.04 mmol の CDDP が確認された. pH 3.0 では 8 時間後で 0.056 mmol, 24 時間後では 0.33 mmol の CDDP が確認された. 一方, 7% 炭酸水素ナトリウム溶液 (pH 8.3-9.0) では, CBDCA が 24 時間後で 79.5% に減少したが, 3.2 分に CDDP のピークは見られず 3.2 分以外の時間に unknown peak が出現し, CBDCA はアルカリ性条件下において分解されたと考えられた.

CBDCA は Cl⁻ 存在下, pH 6.0 より pH 3.0 において 8 時間後以降に CDDP に変化することが認められた. このことから, CBDCA は Cl⁻ 存在下かつ弱酸性条件下で, 水分子より Cl⁻ が付加され

やすくなり、CDDP が生成されたものと考えられた。生理食塩液（pH 3.0）条件下で 0 時間値の CBDCA モル数が低下している原因も、本条件が CBDCA にとって不安定であるためと考えられた。また、CDDP（ランダ注[®]）は生理食塩水（pH 3.0）条件下で極めて安定であると考えられる。

また、生理食塩液に混和すると、8 時間以内に投与しなければならないことが確認された。従って、CBDCA は添付文書指示通り、含有無機塩類輸液に混和するときは 8 時間以内に投与を終了すべき、あるいは 5% ブドウ糖溶液等の Cl⁻ 非含有輸液に混和すべきと考えられた。

結 論

CBDCA の残存率は Cl⁻ 存在下 pH 3.0-6.0 の条件下で 8 時間後から低下し、その要因は CDDP への変換であることが明らかとなった。そのため、Cl⁻ を含有する輸液に混和する場合、8 時間以内に投与すべきであると考えられた。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) Knox RJ, Friedlos F, Lydall DA, Roberts JJ, Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum (II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato) platinum (II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA, *Cancer Res*, 1986, **46**, 1972-1979.
- 2) Kato R, Sato T, Kanamori M, Miyake M, Fujimoto A, Ogawa K, Kobata D, Fujikawa T, Wada Y, Mitsuishi R, Takahashi K, Imano H, Ijiri Y, Mino Y, Chikuma M, Tanaka K, Hayashi T, A Novel Analytical Method of Cisplatin Using the HPLC with a Naphthylethyl Group Bonded with Silica Gel (π NAP) Column, *Biol Pharm Bull*, 2017, **40**, 290-296.