

ヒスチジン銅注射液の安定性およびヒスタミン含有量の検討

河崎陽一^{*1}, 徳永 紳², 松香直行¹, 出石通博¹, 横山紀子¹,
川島理恵子¹, 亀井千晃², 千堂年昭¹, 五味田 裕¹
岡山大学医学部・歯学部附属病院薬剤部¹
岡山大学大学院医歯薬総合研究科薬効解析学²

Stability of Copper Histidinate Injection and
Histamine Formation in Menkes Disease

Yoichi Kawasaki^{*1}, Shin Tokunaga², Naoyuki Matsuka¹, Michihiro Izushi¹,
Noriko Yokoyama¹, Rieko Kawashima¹, Chiaki Kamei²,
Toshiaki Sendo¹ and Yutaka Gomita¹

Department of Hospital Pharmacy, Okayama University Medical and Dental School¹
Department of Medicinal Pharmacology, Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences²

{ Received April 24, 2006 }
{ Accepted August 21, 2006 }

Menkes disease is characterized by inhibition of the absorption and transport of dietary copper. The Okayama University Medical and Dental School uses L-histidine-copper to treat this disease and in the present study, we examined the stability of the copper histidinate injection solution used for this purpose. High-performance liquid chromatography (HPLC) performed on day 56 following injection revealed that histidine levels had dropped to 90.4%, a non-significant decrease and histamine levels were unchanged. Moreover, atomic absorption spectrophotometry revealed that copper concentrations were not significantly decreased (89.7%) between days 0 and 56. Through visual observation, we noted a gradual increase in floats from day 42 to day 56, leading us to suggest that the use of copper histidinate be limited to 1 month.

The above results should alleviate any concern about histamine-associated adverse effects.

Key words — copper histidinate, Menkes disease, histamine, high performance liquid chromatography, atomic absorption spectrophotometer, stability

緒 言

銅は、生体にとって必須の物質である。メンケス病は、セルロプラスミン(Cp)の先天的な産生不良が原因で血清 Cp が低値を示すことにより、小腸粘膜での銅の移送障害を発症する病態といわれている。最近では、遺伝性の Cp 欠損症が報告され¹⁾、本症は Cp 合成遺伝子の突然変異によるものと考えられている。銅はそれ自身では吸収が悪く、ヒスチジン、酢酸あるいは EDTA と錯体を作ることで吸収が促進される²⁾。岡山大学医学部・歯学部附属病院(当院)では、既報に準じて^{3,4)} L-ヒスチジンを採用してヒスチジン銅注射液を無菌調製している。

院内製剤の安定性の検討は、製剤の品質保持などの観点から非常に重要であり、さらに安定性の検討とともに、主薬などからの副産物による生体への影響の検討は副作用などの観点から非常に重要であり、薬剤師の専門性を発揮できる場所である。

L-ヒスチジンはヒスチジン脱炭酸酵素により脱炭酸され、ヒスタミンが生成されると考えられているが、その詳細については明らかでない。また、購入した L-ヒスチジン自体、無菌ではない上にヒスタミンが含有されている可能性も考えられる。さらに、ヒスチジン銅注射液の調製後、注射液中の L-ヒスチジンがヒスタミンに変化している可能性も考えられる。その注射液は患者に皮下注されるため、ヒスタミンを含有している場合、ヒスタミンに起因する頭痛、紅潮、発疹、かゆみおよび嘔

* 岡山市鹿田町 2 丁目 5-1 ; 2-5-1, Shikata-cho, Okayama-shi, 700-8558 Japan

吐等の症状発現の可能性が十分に考えられる。本研究では院内製剤であるヒスチジン銅注射溶液中のL-ヒスチジンおよび銅の安定性、ヒスタミンの含有量、経時的な沈殿形成の有無およびpH変化について検討したので報告する。

実験方法

1. 試薬

L-ヒスチジン(和光純薬工業株), 塩化第二銅・二水和物(和光純薬工業株), 水酸化ナトリウム粒状(和光純薬工業株), ヒスタミン二塩酸塩(片山化学工業株), 四ホウ酸ナトリウム十水和物(Borax)(和光純薬工業株), N-acetyl-L-cysteine (NAC) (Sigma), *o*-phthaldialdehyde (OPA) (Sigma), アセトニトリル(高速液体クロマトグラフ用)(Sigma-aldrich Japan)を用いた。試薬は, すべて特級品を用いた。超純水は超純水製造装置(simpli LAB; 日本ミリポア株)を用いて, イオン交換水はイオン交換水製造装置(オートスチールWA-33; ヤマト科学株)を用いてそれぞれ調製した。

2. 使用機器

ヒスチジンおよびヒスタミン濃度測定は, 高速液体クロマトグラフィー(オートサンプラー, 蛍光分光光度計: F-1050(株)日立製作所), ポンプ, カラムヒーター: RE-8000(株)東京商会), カラム: Asahipack ODP50 4E(Shodex, 4.6×250mm)を用いた。溶液中銅濃度測定には, 原子吸光光度計(Z-9000形日立偏光ゼーマン原子吸光光度計(株)日立製作所)を用いた。pH測定には, pHメーター(パーソナルpHメーター90 series TPX-90(株)東興化学研究所)を用いた。

3. 調製方法

ヒスチジン銅注射液の調製方法

クリーンベンチ(SCV-W-1600BS(株)トーショー)内における無菌操作で, 乾熱滅菌済100mLビーカーに注射用生理食塩液(大塚製薬株)を適量入れ, 塩化銅およびL-ヒスチジンを秤取しスターラーを用いて溶解した。その溶液をpHメーターでpHを測定しながらNaOH溶液を加えてpH7.4に調整した後, 注射用生理食塩液でメスフラスコを用いて全量100mLとした。調製した溶液をMillex®-LG(0.20μm, 25mm(Millipore Corporation, USA))でろ過し, 滅菌済の褐色バイアル(マルエム製バイアル瓶No. 3 10mL)に5mLずつ充填・封印した。ここで使用したNaOH溶液は, NaOHを生理食塩水に溶解して1.60g/100mL(0.4M)としたものである(Table 1)。

Table 1. ヒスチジン銅注射液・5mL/V (Cuとして1mg/mL)の処方内容

塩化銅(II)・ニ水和物	268.8mg
L-ヒスチジン	488.8mg
大塚 注射用生理食塩液	適量
0.4M 水酸化ナトリウム溶液	適量
全量	100mL (pH 7.4)

試薬の調製方法および測定法

1. HPLCによるヒスチジンおよびヒスタミン含有量の測定

1) 溶離液の調製

Borax 23.244gを精秤して超純水を加え, メスフラスコを用いて全量1Lとし, Borax溶液を調製した。別の1LメスフラスコにOPA 134.1mgおよびNAC 163.2mgを入れ, アセトニトリル180mL中にBorax溶液を加えメスフラスコを用いて全量1Lとし, スターラーで攪拌して固形分を完全に溶解させた。その溶液をミリポアフィルターを用いて吸引ろ過すると同時に超音波槽に褐色の試薬瓶を入れて脱気した。

2) ヒスチジン標準液の調製

L-ヒスチジン(特級)を1.5516mg精秤し, 生理食塩水100mLを加え溶解して 10^{-4} mol/mLを調製した。その溶液を段階希釈して 5×10^{-5} および 1×10^{-5} mol/mLのヒスチジン標準液を調製した。

3) ヒスタミン標準液の調製

ヒスタミン二塩酸塩を18.407mg精秤し, 生理食塩水をメスフラスコに入れ全量10mLとして 10^{-5} mol/mLを調製した。この溶液を段階希釈して 1×10^{-10} , 10^{-11} および 10^{-12} mol/mLのヒスタミン標準液を調製した。

4) ヒスチジン銅注射液試料の調製

ヒスチジン銅注射液は, マイクロピペットを用いて0.1mL遠沈管に採取し, メスフラスコで全量10mLとし十分攪拌した。

5) HPLCの測定法

測定条件は, 試料注入量10μL, 溶離液の流速0.5mL/min, 蛍光検出器の励起波長340nmおよび蛍光波長450nmに設定した。試料は, 1検体につき3回繰り返し測定し, その平均値を採用した。また, 試料はろ過などの特別な処理をせずに使用した。

2. 原子吸光光度計による溶液中の銅濃度測定

1) 銅標準液の調製

銅標準液の調製には, 原子吸光分析用標準液銅標準液(Cu 1000ppm)(ナカライテクス株)を用い, イオン交換水にて段階希釈して25, 50および100ppbの標準溶液を調製した。

2) 試料の調製

ヒスチジン銅注射液100 μ Lをメスフラスコに採取し、イオン交換水を加え全量100mLとした。その溶液から4mLとり、イオン交換水を加えメスフラスコを用いて全量20mLした。

3) ヒスチジン銅注射液中の銅濃度測定法

試料注入量20 μ L、波長324.8nmに設定し、キュベットはチューブを使用して検量線および試料を1検体につき3回繰り返し測定し、その平均値を採用した。

3. ヒスチジン銅注射液の経時的 pH 変動測定

試料溶液は、5 $^{\circ}$ Cに設定した冷蔵庫(MPR-1010R(株三洋電機))内で冷所保存し、pH測定時は溶液の温度が23~25 $^{\circ}$ Cになってから測定した。

4. 目視による沈殿物および浮遊物の確認

シャーレ内で冷所保存してあるヒスチジン銅溶液の1週間毎の変化を目視にて観察し、写真にて記録した。

統計処理

HPLCによるヒスチジンおよびヒスタミン含有量、原子吸光度計による注射液中の銅濃度のデータは、一元配置分析(ANOVA)を行った後、Dunnnettを用いて解析した。

結果

1. HPLCによるヒスチジンおよびヒスタミン含有量の検討

HPLCの検量線の直線性は、相関係数 $r=0.9999$ であった。また、検出限界は 1×10^{-12} mol/mLであった。

Fig. 1に、ヒスチジンおよびヒスタミンの標準液中に

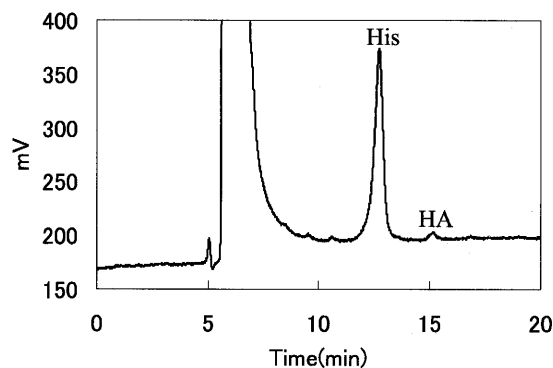


Fig. 1. ヒスチジンおよびヒスタミン標準液の保持時間およびピーク高さ
濃度(mol/mL); L-ヒスチジン(His): 5×10^{-5} ヒスタミン(HA): 5×10^{-10} 保持時間(min); His: 12.74 HA: 15.17

おけるクロマトグラムを示した。Fig. 2に、調製直後から56日目までのヒスチジンおよびヒスタミンの経時的な残存率および生成量の変化について示した。

HPLCによるヒスチジンおよびヒスタミン含有量の検討では、調製直後から28日目まではヒスチジン濃度に有意な変化はなかった。しかし、56日目では90.4%まで残存率が低下しており、調製直後と比してヒスチジンの有意な低下($P < 0.05$)が認められた。一方、ヒスタミンは、調製直後から56日目のいずれにおいても検出されなかった。

2. 原子吸光度計による水溶液中の銅濃度の検討

原子吸光度計による水溶液中の銅濃度の検討では、調製直後から28日目までは銅含有量に大きな差は認められなかった。しかし、56日目では、89.7%まで銅の平均含有量が低下していたが、測定値のバラツキが大きく有意な差は認められなかった(Fig. 3)。

3. ヒスチジン銅の経時的 pH 変動の検討

ヒスチジン銅のpHは、調製7日目以降から徐々に酸性側に移行し56日目にはpH7.17を示した(Fig. 4)。

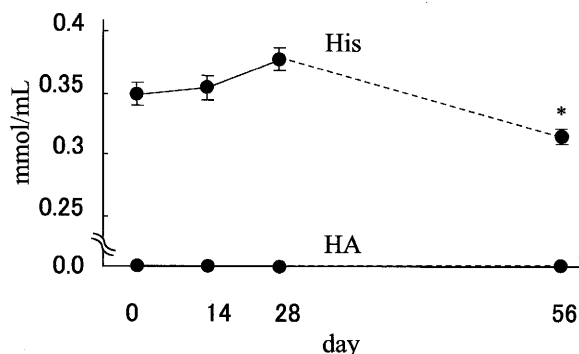


Fig. 2. HPLCにおけるヒスチジンおよびヒスタミン濃度変化
L-ヒスチジン(His) ヒスタミン(HA) * $P < 0.05$ vs. day 0

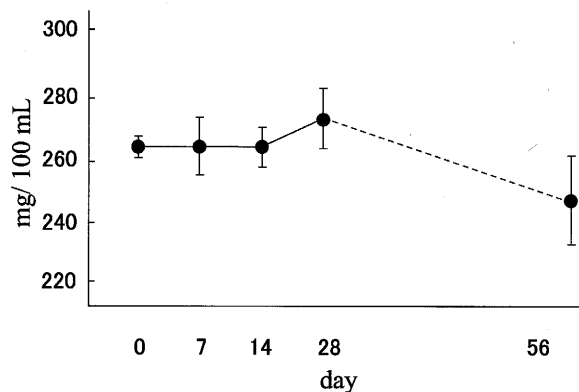


Fig. 3. 原子吸光度計によるヒスチジン銅注射液中の銅濃度変化

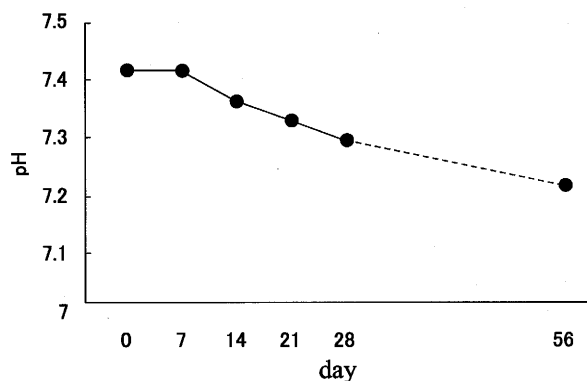


Fig. 4. ヒスチジン銅注射液の pH 変化

4. 目視による沈殿および浮遊物の検討

目視による沈殿および浮遊物の検討では、調製直後から28日目までは変化が認められなかった。しかし、42日目から細かな浮遊物が認められ、その浮遊物は観察期間56日目まで徐々に増加し、注射液全体の色調を変化させた (Fig. 5)。

考 察

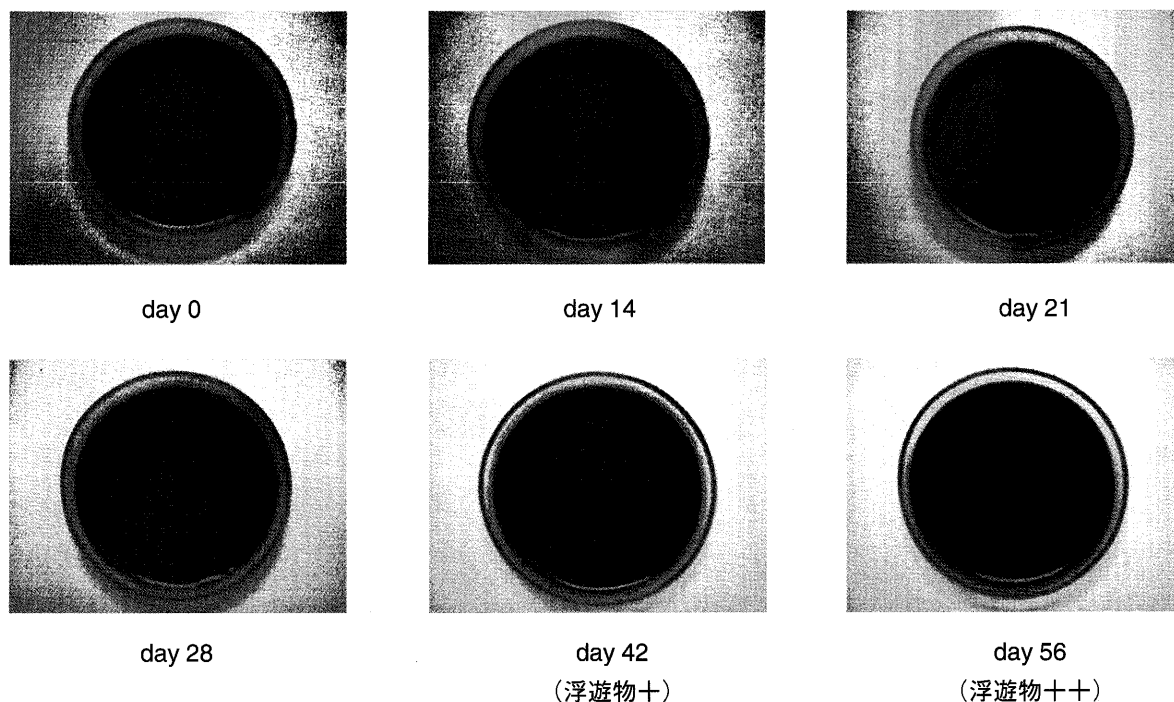
メンケス病は、食物中の銅の吸収や運搬に障害があり、その結果、銅が欠乏して色が薄く折れやすい毛髪になるのが特徴である。重症型の場合、運動機能や知能の発達に遅れがみられ、髪の色が薄く青白い顔色になる。

その原因は遺伝による先天性疾患で、治療には銅の補充療法が有効と考えられている。

ヒスチジン銅は、酢酸銅あるいはEDTA-銅と比べて非経口投与において脳への取り込みが最も優れていると報告されている⁵⁾。一般的にヒスチジン銅は、毎日あるいは1週間に2~3回、1回に200~1000 μ gの範囲で投与される⁶⁾。

HPLCによるヒスチジンおよびヒスタミン含有量の検討では、調製直後から28日目まではヒスチジン濃度に有意な変化はなかったが、56日目では90.4%まで残存率が低下しており、調製直後と比してヒスチジンの有意な低下 ($P < 0.05$) が認められた (Fig. 2)。その一方で、ヒスタミンは、調製直後から56日目のいずれにおいても検出されなかった。このことより、28日を超えると徐々にヒスチジン含量が低下していくことが示唆されたが、56日目までの検討では、ヒスタミンを含有しなかったことから、28日目以降に徐々に低下したヒスチジンはヒスタミンに変化していないことが示唆された。今回、含有量が低下した分のヒスチジンが、ヒスタミンでなく何に変化したかは現在にところ不明である。これについては、今後詳細に検討する予定である。

原子吸光度計による水溶液中の銅濃度の検討では、調製直後から28日目までは銅含有量に大きな差は認められなかった。しかし、56日目では、89.7%まで銅含有量が低下していたが、測定値のバラツキが大きく有意な差は認められなかった (Fig. 3)。また、目視による沈殿お

Fig. 5. 目視によるヒスチジン銅注射液の変化
○印：浮遊物

よび浮遊物の検討では、調製直後から28日目までは変化が認められなかった。しかし、42日目から浮遊物が認められ、その浮遊物は観察期間56日目まで徐々に増加した (Fig. 5)。このことより、銅濃度が低下し、pHが経時的に減少した原因は、水溶液中の銅と水酸化ナトリウムが反応して、水酸化銅が生成されたためと考えられる。事実、目視による水溶液の変化の検討では、42日目から浮遊物が確認された。

ヒスチジンの残存率、水溶液中の銅濃度、pH変化および目視による水溶液中の沈殿・浮遊物の結果より、ヒスチジン銅の使用期限は調製後冷所保存で1カ月に設定することが望ましいことが示唆された。

一方、投与された後のヒスチジンの代謝経路として、ヒスチジンは、血液脳関門を通過して脳内でヒスタミンに変化することは周知の事実であり、これにより脳内ヒスタミン量が増加することによるストレス障害などが起こる⁷⁾可能性も示唆される。現在、メンケス病における脳内のヒスタミンの turnover に関する報告がないことから、今後は投与したヒスチジン銅の脳内におけるヒスタミンへの変化量を測定することにより、体重あたりの換算で投与されるヒスチジン銅投与量に対する脳内ヒスタミン生成量を明確にしたい。

引用文献

- 1) Z. Tumer, M.L. Birk, N. Horn, Screening of 383 unrelated patients affected with Menkes disease and finding of 57 gross deletions in ATP7A, *Hum. Mutat.*, **22**, 457-464 (2003).
- 2) B.J. Kirodian, N.J. Gogtay, V.P. Udani, N.A. Kshirsagar, Treatment of Menkes Disease with Parenteral Copper Histidine, *Indian Pediatrics*, **39**, 183-185 (2002).
- 3) 日本病院薬剤師会編, “病院薬局製剤 第5版”, 薬事日報社, 東京, 2003, p.57.
- 4) 酒井正博, 上野芳男, 安生紗枝子, 中村幹夫, 加藤尚之, ヒスチジン銅注射液の安定性, *病院薬学*, **20**, 55-60 (1994).
- 5) A. Barnea, B.M. Katz, Uptake of ⁶⁷Copper complexed to 3H-histidine by brain hypo-thalamic slices, Evidence that dissociation of the complex is not the only factor determining ⁶⁷Copper uptake, *J. Inorg. Biochem.*, **40**, 81-93 (1990).
- 6) S.G. Kaler, Menkes disease, *Av Pediatr.*, **41**, 263-304 (1994).
- 7) 谷内一彦, 岡村信行, 倉増敦朗, 中枢ヒスタミン神経の解剖とその機能, *アレルギー・免疫*, **12**, 264-269 (2005).