

## 研究の背景

体内に投与された化合物は薬物代謝酵素により様々な代謝物に化学変換される。これら代謝物が実際に効果を発揮する場合や、副作用の本体となることがあるため医薬品開発において代謝物検索は重要である。このような代謝を含む ADME の問題で医薬品開発が中断するケースが多い。そのため、医薬品候補物質の段階で代謝物を確定することは医薬品開発における不成功確率を低下させ効率化につながると考えられる。

薬物代謝の第一相反応の約 90%を担うのがシトクロム P450 である。この酵素は酸素分子の還元的活性化を行い非常に強力な酸化活性種を生成し、炭化水素の水酸化、芳香環の水酸化、N-脱アルキル化、O-脱アルキル化、S-酸化など様々な反応を触媒する。これらの既知代謝反応を念頭におき、反応点の電子密度、立体障害を考慮すれば、かなりの確率で化合物の構造から代謝物を予測することが可能である。さらに代謝に関与するシトクロム P450 分子種も化合物の構造からある程度予測できる。このような状況下で代謝物予想の確度を向上させる方法として、シトクロム P450 が触媒する未知反応様式を明らかにすることが上げられる。

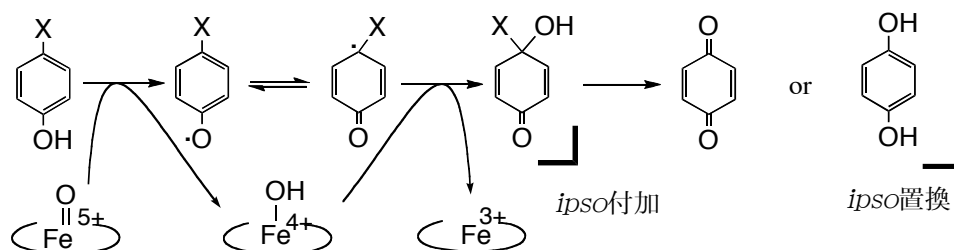


Fig. 1 ipso 付加反応と ipso 置換反応

この考えに基づき、我々は様々な新規シトクロム P450 触媒反応を検索し、フェノール類の ipso 位代謝(Fig. 1)や、芳香族アミン類、フェノール類のカップリング反応を明らかにしてきた。さらに反応機構の解析、環境ホルモン類の ipso 位新規代謝様式の解明などを行ってきた。以下に解明したビスフェノール A の新規代謝様式を示す。

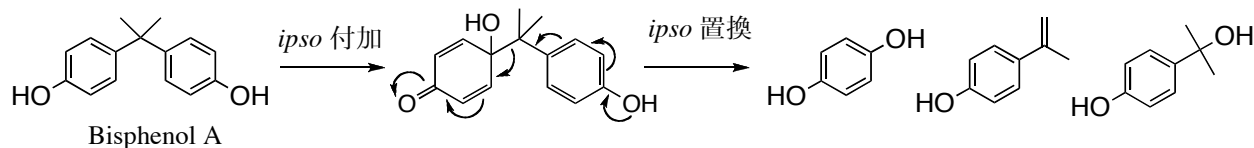


Fig. 2 ビスフェノール A の新規代謝様式

## 研究目的

置換フェノール類は ipso 付加と ipso 置換反応を受けるが、どちらが進行するか

は置換基の種類によって決まることを示してきた。また、置換基の酸化によっても付加、置換の選択性は変化する。この *ipso* 付加と *ipso* 置換反応のスイッチングを実際の医薬品や環境物質の構造から推測し、それらが P450 反応で得られることを証明する。これらの結果の蓄積は、化合物の構造から代謝物を予測する確率の向上につながる。

初年度はすでに明らかにしたビスフェノール A の新規代謝様式をもとに、構造が類似している大腸刺激性下剤であるビスコジルの活性体（デアセチルビスコジル **1**）の代謝様式を推定し、実際にその代謝物が得られるか検討した。アルキルフェノール類は *ipso* 付加反応となることをすでに示していたが、ビスフェノール A ではその特異的構造から *ipso* 置換反応が進行していた。これより予想した **1** の代謝様式を Fig. 3 に示す。

## 研究方法・結果

ラット肝ミクロソームあるいはヒト P450 発現細胞ミクロソームと基質を 30 分間反応させ、酢酸エチルで抽出した。これを TMS 誘導化して GC-MS により分析した。代謝物の同定は、標品と保持時間および MS パターンを比較して行った。

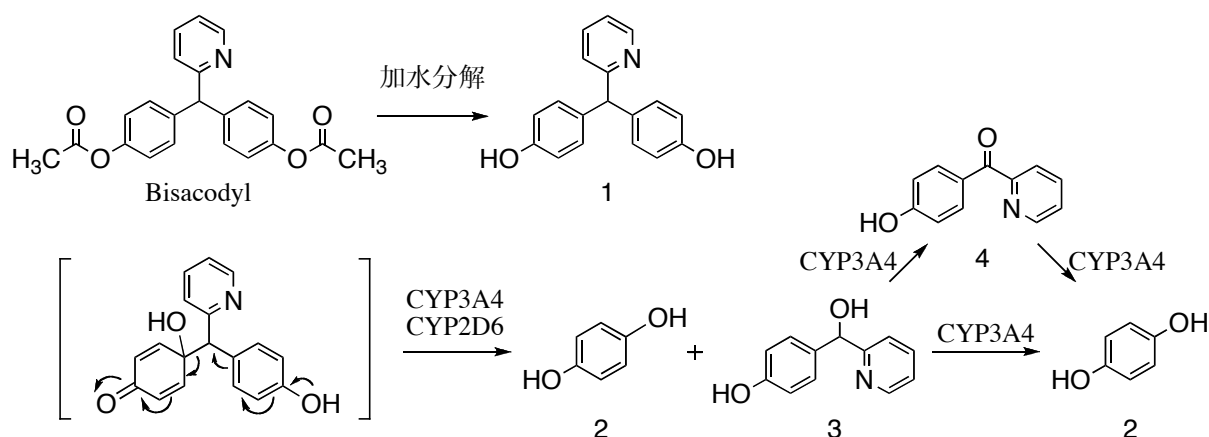


Fig. 3 ビサコジルの新規代謝様式

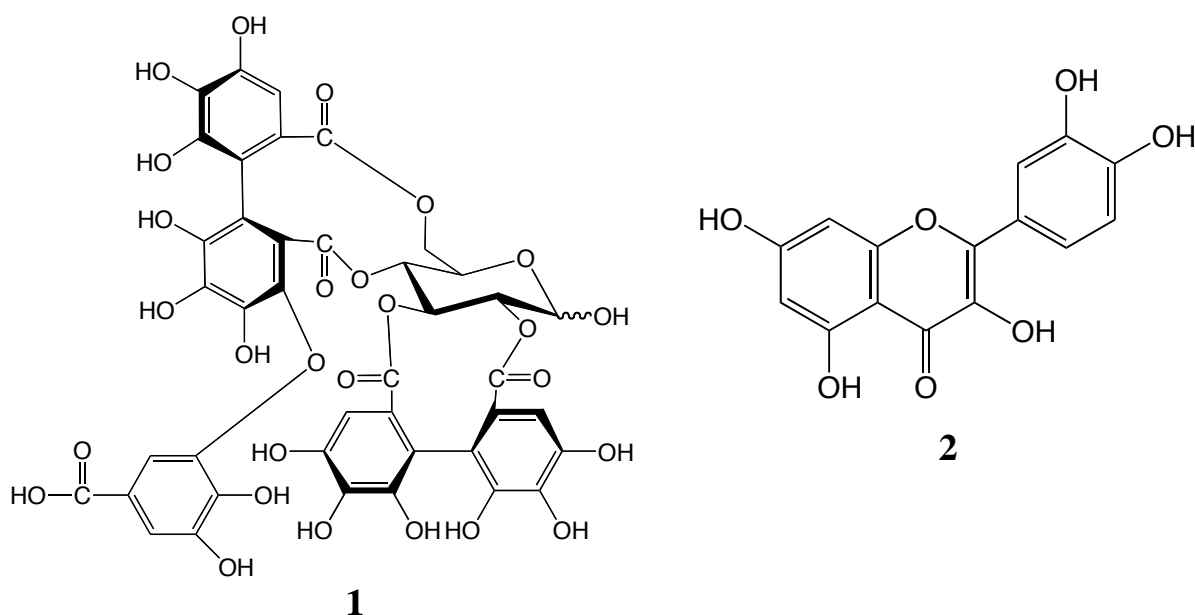
予想通り **1** が P450 依存的に *ipso* 置換反応を受けること、その反応に関与する P450 分子種は 3A4 と 2D6 であることを明らかにした。

単純なアルキルフェノールや、4-フェニルフェノー *ipso* 付加代謝で止まるが、ビスフェノール A や **1** では置換まで進行するのはキノール中間体が立体的に不安定なためと、Fig. 3 に示す酸素原子からの電子供与効果によると考えられる。

さらに脱離生成物 **3** 及びその酸化体 **4** はフェノールの置換基としてヒドロキシメチルとケトンを持ち、これらの構造は従来の知見より *ipso* 置換を受けると予想できる。そこで **3** 及び **4** の代謝を検討したところ、ヒドロキノン(**2**)を代謝物として得た。

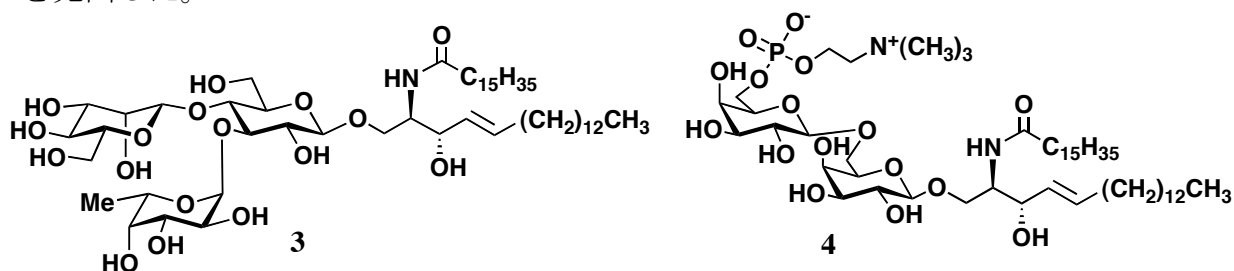
ビスコジルから脱アセチル体(**1**)が生成することは報告されていたが、今回、**1** の化学構造から予測した通りの新規代謝物が生成することを明らかにした。

消化管での薬物代謝は、経口投与された薬物や異物の代謝解毒排泄機構に重要な役割を果たしていると考えられている。このことを背景に、硫酸転移酵素阻害活性を指標としてサプリメントや食品の二次代謝産物に着目している。我々はこれまでにザクロ果汁より見出されたタンニン的一种であるプニカラギンに強いフェノール硫酸転移酵素阻害活性がみられることを報告してきた。今回、健康茶として花粉症等の炎症性疾患の予防効果が注目されているバラ科の甜茶及び、アントシアンを豊富に含み健康食品として飲料されているアロニア果汁の成分について探索した。甜茶においてはジテルペン配糖体、エラジタンニン類、フラボノイド等16種の化合物を単離精製し、ヒト結腸癌由来細胞株Caco-2を用いてフェノール硫酸抱合反応に対する影響について検討し、活性本体がエラジタンニン**1**及びその類縁体であることを見出した。今後さらにこの構造の持つsanguisorboyl基の数や結合位置に着目して構造活性相関について検討する予定である。アロニア果汁においては硫酸転移酵素の一種であるエストロゲン硫酸転移酵素阻害を指標として成分探索を行ってきた。その結果、フラボノイドを含む画分に活性がみられ、特にケルセチン**2**に最も強い阻害活性がみられた。今後は現在単離精製されたフラボノイドの構造を解明し、甜茶同様、構造活性相関について検討する。



我々は高等動物からは見出されない糖脂質を無脊椎動物に求め、これらを合成することによりその機能解明及び創薬を目指している。これまでに、節足動物であるキシヤスデ由来糖脂質**3**にメラノーマ細胞増殖抑制及びFAK, Erkのリン酸化抑制が見いだされたことから、さらなるメカニズム追求のために、この糖脂質の効率的な合成を行った。糖鎖構造はMan  $\beta$  1-4(Fuc  $\alpha$  1-3)Glc  $\beta$  1-構造をとっており、糖の化学合成において最も困難とされている $\beta$ -マンノシド結合を持っている。この構築法は多くの化学者によって行われており、中でも① $\beta$ -グルコシドの2位を反転して $\beta$ -マンノシド結合を得る方法、②分子内アグリコン転位反応、③環状オルソエステル還元開裂による方法、④スルホキシドを用いたS<sub>N</sub>2型の直接 $\beta$ -マンノシド合成などがあるが、今回はグラムスケールで効率よく合成できると考え、①のグルコタイプの2位を反転さ、 $\beta$ -マンノース結合を構築し、三糖糖脂質の合成を完了した。生物活性においては上述の如くFAK, Erkの活性化を抑制していることにより、メラノーマ転移も抑制する可能性がある。従って今後はまず、*in vitro*で細胞の運動性、浸潤性を調べる予定である。さらに本化合物が免疫細胞の応答にどのような影響を与えるかを検討し、糖脂質の免疫機能調節能を明らかにする。1つにはリポソームを作成後マウス脾臓細胞と培養し、サイトカイン産生能を測定する。また、リポソーム内にモデル抗原（卵白アルブミン）を封入し、このリポソームを腹腔内に投与して腹腔マクロファージを採取する。その後マクロファージを適時*in vitro*で培養し、マクロファージ上のMHC分子や補助刺激分子などの発現をFACSで解析する。さらにマクロファージのmRNAを単離して、各種分子（iNOS、CCR7などケモカインレセプター）の発現の変化をPCRで検討する。これらの実験によりNKT細胞の活性化に関与している可能性が示唆できればと考えている。一方でNKT細胞の活性化とは直接関係なく免疫系を活性化できる可能性もある。すなわちマンノースレセプターを介して抗原提示細胞の機能を調節することができることを示すことが後者の実験により期待できる。

一方、フトミミズより見出されたホスホコリン含有糖脂質**4**の糖鎖部分にマウス由来マクロファージにおけるIL-12及びTNF  $\alpha$  産生誘導活性、並びにLPS刺激によるIL-12の産生抑制活性を示したことから免疫調節機能が示唆されたため、さらなる機能解明を目的としてこの糖脂質の全合成及び誘導体の合成を行い、IL-8の誘導活性を調べ、構造活性相関の精査により、活性発現にホスホコリン糖鎖とセラミドの重要性を見出した。



## 【目的】

カルバペネム系抗菌薬（カルバペネム薬）やキノロン系抗菌薬は、広域な抗菌スペクトラムや強い抗菌活性を有し、種々の感染症に使用されているが、いずれも痙攣誘発を有することが問題となっている。しかしながら、その詳細なメカニズムについては明らかとなっていない。本研究においては、これらの抗菌薬の体内動態および脳内動態について検討するとともに、中枢神経系移行に影響を与える因子について検索し、痙攣誘発のメカニズムについて検討する。今年度は、カルバペネム系薬の血中濃度および脳内含量の測定法について検討し、マウスにカルバペネム薬を投与した際の、血清中濃度および脳内含量を測定する。

## 【方法】

### 1.カルバペネム系薬の血清中濃度および脳内含量測定法に関する検討

カルバペネム系薬として、imipenem (IPM)、panipenem (PAPM)、meropenem (MEPM)、biapenem (BIPM)、doripenem (DRPM) を用い、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により Hikida らの方法 (Antimicrob Agents Chemother 1992;36(2):481-483.) に修正を加え、HPLC 測定条件の最適化を行った。

### 2.カルバペネム系薬のマウス血清中動態および脳内動態に関する検討

IPM、MEPM、BIPM あるいは DRPM を同量の cilastatin (CS) とともに 91 mg/kg の用量でマウス (ddY 系、雄、5 週齢) に皮下投与し、投与 10、20、30、60、120 分後にジエチルエーテル麻酔下により断頭し、血液および脳を採取した。血液は遠心分離を行い、血清中の濃度を HPLC により測定した。脳はホモジナイズし、上清から脳内含量を測定した。統計解析は Tukey の多重比較法を用い、有意水準を 5% とした。

## 【結果】

### 1.カルバペネム系薬の血清中濃度および脳内含量測定法に関する検討

本測定法は、HPLC システム自体を変更することなく、移動相における 0.1 M リン酸緩衝液の pH およびメタノールとの組成比を調製するだけで、5 種類のカルバペネム系薬の血清中濃度および 4 種類のカルバペネム系薬の脳内含量が測定可能であった。また、カルバペネム系薬の測定を妨害するマウスの生体成分由来のピークは認められず、検出感度、回収率および同時再現性は良好であった (Table 1、2)。

Table 1. マウス血清中カルバペネム系薬の HPLC 条件と分析精度

	移動相組成比 (v/v%)	保持時間 (min)	検出限界 (ng/mL)	回収率 (%) <sup>c</sup>	変動係数 (%) <sup>d</sup>
IPM	92: 8 <sup>a</sup>	4.4	20	102.2 ± 3.6	3.5
BIPM	92: 8 <sup>a</sup>	4.9	20	105.1 ± 3.7	3.5
PAPM	87: 13 <sup>b</sup>	4.5	20	106.4 ± 4.3	4.1
MEPM	78: 22 <sup>b</sup>	9.0	40	102.0 ± 3.5	3.5
DRPM	90: 10 <sup>b</sup>	9.8	40	91.7 ± 1.9	2.1

a; 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.8) : メタノール

b; 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) : メタノール

c; mean ± SD, n=8

d; 同時再現性

Table 2. マウス脳内カルバペネム系薬の HPLC 条件と分析精度

	移動相組成比 (v/v%)	保持時間 (min)	検出限界 (ng/mL)	回収率 (%) <sup>c</sup>	変動係数 (%) <sup>d</sup>
IPM	96: 4 <sup>a</sup>	6.9	40	90.1 ± 2.5	2.7
BIPM	98: 2 <sup>a</sup>	11.1	40	89.8 ± 2.4	2.7
MEPM	78: 22 <sup>b</sup>	9.0	40	81.9 ± 3.0	3.7
DRPM	90: 10 <sup>b</sup>	9.8	40	84.2 ± 1.6	1.9

a; 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.8) : メタノール

b; 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) : メタノール

c; mean ± SD, n=8

d; 同時再現性

### 2.カルバペネム系薬のマウス血清中動態および脳内動態に関する検討

マウスの血清中カルバペネム系薬濃度は、投与 10 分後において、DRPM が IPM

に対し有意に高いことが認められた ( $p<0.05$ ) が、その他のカルバペネム系薬間における有意な差は認められなかった。また、血清中濃度は、投与 11-13 分後 ( $T_{max}$ ) に最高血清中濃度 (DRPM>BIPM>MEPM>IPM) が得られ、その後、時間とともに低下した (Fig. 1)。さらに、血清中濃度曲線下面積は DRPM>MEPM>BIPM>IPM の順であった。

一方、脳内含含有量に関しては、投与 8-16 分後 ( $T_{max}$ ) に最高脳内含含有量が得られ、その後、時間とともに低下した (Fig. 2)。投与 10 分後の IPM の含有量は、MEPM および BIPM に対し有意に高いことが認められ ( $p<0.05$ )、脳内含含有量曲線下面積は最高脳内含含有量と同様に IPM>DRPM>MEPM>BIPM の順であった。さらに、IPM は 120 分後においても脳内に残存していることが認められた。

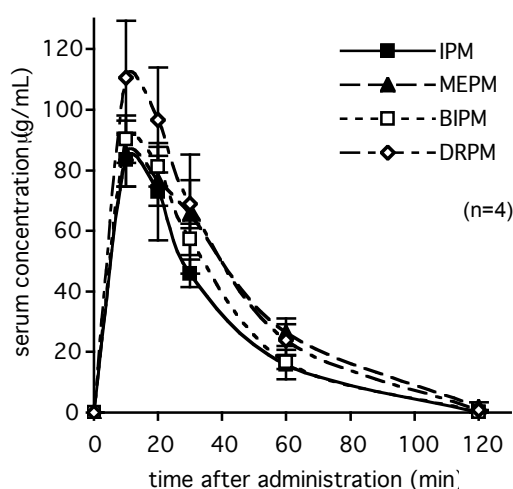


Fig. 1 カルバペネム系薬の血清中濃度推移

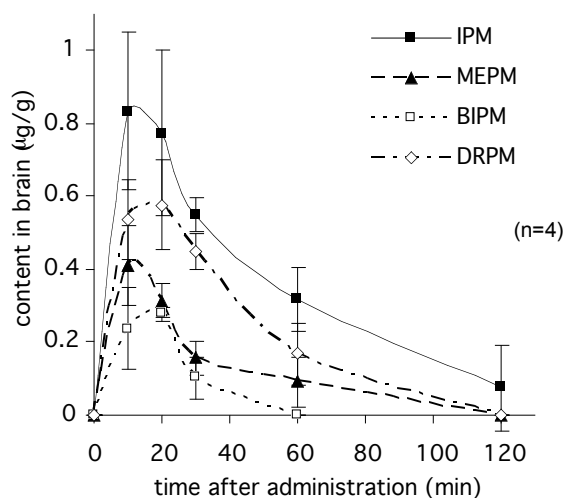


Fig. 2 カルバペネム系薬の脳内含含有量推移

### 【考察】

各カルバペネム系薬の脳内動態における  $T_{max}$  は血清中動態における  $T_{max}$  とほぼ一致したものの、その他の脳内動態は血清中の薬物動態と一致しなかった。また、IPM の脳内含含有量が持続する傾向が認められた。今後は、臨床における使用を鑑み、カルバペネム系薬の複数回投与における残存量の挙動や高用量での検討を行い、痙攣誘発に関与する因子を解明していく予定である。

### 【発表論文】

- Kurihara Y, Kizu J, Hori S. Simple and rapid determination of serum carbapenem concentrations by high-performance liquid chromatography. J Infect Chemother14(1) : 30-34, 2008

### 【学会発表】

- 栗原裕司, 木津純子, 堀誠治, 川村将弘 : HPLC によるカルバペネム系抗菌薬の簡便な測定法の確立. 第 55 回日本化学療法学会総会 (2007)
- 栗原 裕司, 木津純子, 堀 誠治 : 各種カルバペネム系抗菌薬測定法の確立と応用. 第 17 回日本医療薬学会年会 (2007)