

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場合が多い。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。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。

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 (BPA) の新規代謝様式を示す (Fig. 1)。

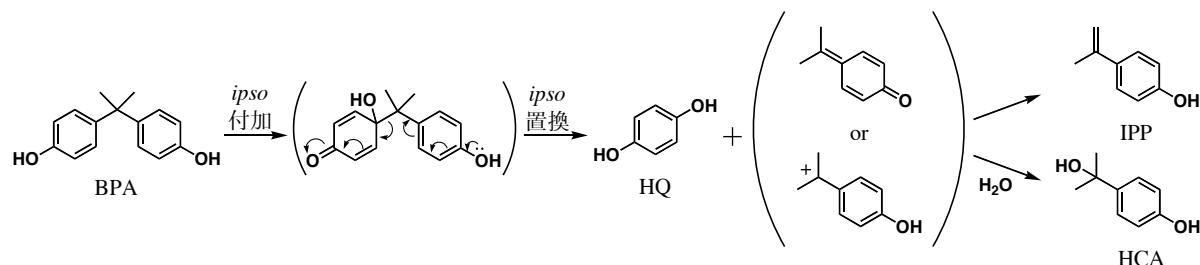


Fig. 1 ビスフェノール A の新規代謝様式

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 BPA 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ピサコジルの活性体（デアセチルピサコジル）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。2, 3 年目はさらに、有機塩素系殺虫剤メトキシクロル (MXC) に着目した。MXC は内分泌攪乱物質のひとつであり、既知代謝経路として O-脱メチル化、環の水酸化、さらにこれら代謝物のグル

クロン酸抱合などが知られている。本研究では、BPA と類似の構造を有する MXC およびその活性代謝物 HPTE に着目し BPA と同様の *ipso* 置換反応による新規代謝物として TCHEP を予想した (Fig. 2)。BPA と共通するビスフェノール骨格における *ipso* 置換反応の一般性について、さらに MXC のエストロゲン様作用発現に *ipso* 位代謝物が与える影響について検討することを目的とし、MXC および HPTE の新規 *ipso* 位代謝物検索、およびそれらのエストロゲン活性の検討を行った。

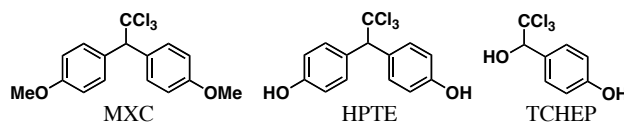


Fig. 2 MXC、HPTE と予想 *ipso* 位代謝物

結果と考察

HPTE を基質として、ラット肝ミクロソームおよび NADPH 産生系と共にインキュベーションし、反応液を酢酸エチルで抽出した。抽出物を TMS 誘導体化し、GC-MS を用いて分析したところ、予想に反して TCHEP は検出されなかった。一方、代謝抽出物中に m/z 260 の未知代謝物とみられるピークが検出され、同位体イオンピークから Cl が 2 原子含まれることが示唆された。そこで新たに代謝物 DCVP を予想し、これを合成し標品としたところ、DCVP の生成を確認した。生成量は 0.26 ± 0.14 (nmol/nmol P450) だった。これらの生成はミクロソーム、NADPH に依存しており、P450 による HPTE の *ipso* 置換反応の進行が明らかとなった。また、MXC を基質としたところ、DCVA: 0.06 ± 0.01 、DCVP: 0.10 ± 0.01 (nmol/nmol P450) の生成も

確認できた (Fig. 3)。さらに、DCVP のエストロゲン受容体 (ER) 結合親和性についても検討したところ、DCVP の ER 結合親和性は、HPTE より弱く MXC と同程度であった。

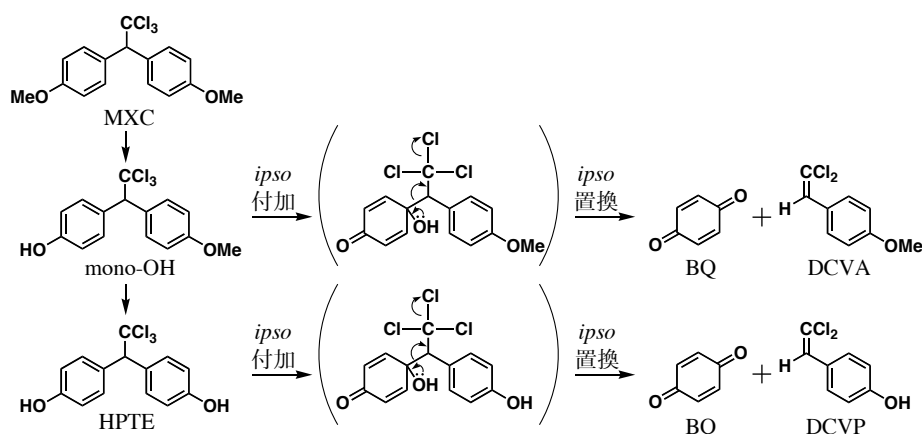


Fig. 3 MXC の新規代謝経路

以上のことから、MXC は P450 により脱メチル化された後、さらに *ipso* 置換反応を受けて新規代謝物 DCVP、DCVA を生成することを明らかにした。脱離機構は BPA と同様の機構で進行すると予想したが、実際には HPTE は *ipso* 位の水酸化を受けた後、BQ、DCVP を生成する Fig. 3 の機構で進行した。HPTE は脱離可能な塩素を含んでいるため BPA とは異なる反応機構になったと考えている。

本研究において明らかとなった新規代謝経路は、従来の既知 P450 代謝反応からは予想できないものであり、*ipso* 位代謝反応を考慮して初めてこれら新規代謝物を見出すことができた。未知の代謝様式をさらに明らかにすることにより、医薬品等の代謝物予測の幅を広げることが可能になると思われる。

薬物動態に影響を及ぼす因子の解析による効率的医薬品開発と副作用軽減

天然医薬資源学講座

木内文之・羽田紀康・成川佑次

研究課題

1. 医薬品の副作用軽減を目指したサプリメント及び食品由来天然物の探索
2. 免疫機能調節を指標とした複合糖質の合成

上記2件の研究課題のもと具体的に以下の研究を行っている。

1.

1) 薬物代謝第Ⅱ相系酵素群に影響を与える天然由来物質の研究

近年、セントジョーンズワートやグレープフルーツジュースといったハーブ及び食品由来成分が薬物代謝酵素の誘導や阻害を引き起こすことが明らかとなり、薬物代謝酵素に対する天然由来物質の影響に関心がもたれている。そこで我々は薬物代謝酵素のうち、外来異物の解毒や排出を促す機能を有する第Ⅱ相系酵素群に着目し、それらの酵素群に対して影響を与える食品・ハーブおよび和漢薬などの天然由来成分の探索研究に着手した。

まず、酸化ストレスや発がん物質の解毒に関わる酵素群の誘導活性についてマウス肝癌細胞株 Hepalclc7 を用いたキノンレダクターゼ誘導活性を指標として各種食用・薬用植物の水あるいはエタノール抽出物をスクリーニングしたところ、各種シソ科ハーブ類に顕著な誘導活性が認められた。特に、ホワイトセージ (*Salvia apiana* JEPSON) のエタノール抽出物に高い活性が認められたことから、活性成分の探索を行い、アビエタン型ジテルペン類にキノンレダクターゼをはじめとする各種解毒酵素群の誘導活性があることを見いだした。

また、薬物代謝第Ⅱ相系酵素群の中にはホルモンやカテコールアミンなどの内因性生理活性物質の代謝に関与するものもあり、生体の恒常性の維持や各種病態の発生・進行に影響を及ぼす可能性が示唆されている。そこで、女性ホルモンであるエストロゲンの代謝に関与するエストロゲン硫酸転移酵素(EST)の阻害活性を有する成分の検索を行った結果、バラ科の耐寒性果樹であるアロニア(*Aronia melanocarpa* ELLIOT)果実の抽出物に高い EST 阻害活性が認められ、quercetin などのフラボノイドが EST 阻害活性を示すことを明らかにするとともにその構造と活性の相関について検討を行った。

同様にして、フェノール硫酸転移酵素(PST)の阻害活性についても検討を行った結果、ザクロ(*Punica granatum* L.)や甜茶(*Rubus suavissimus* S. LEE)より得られたエラジタンニン類に強い PST 阻害活性が認められた。

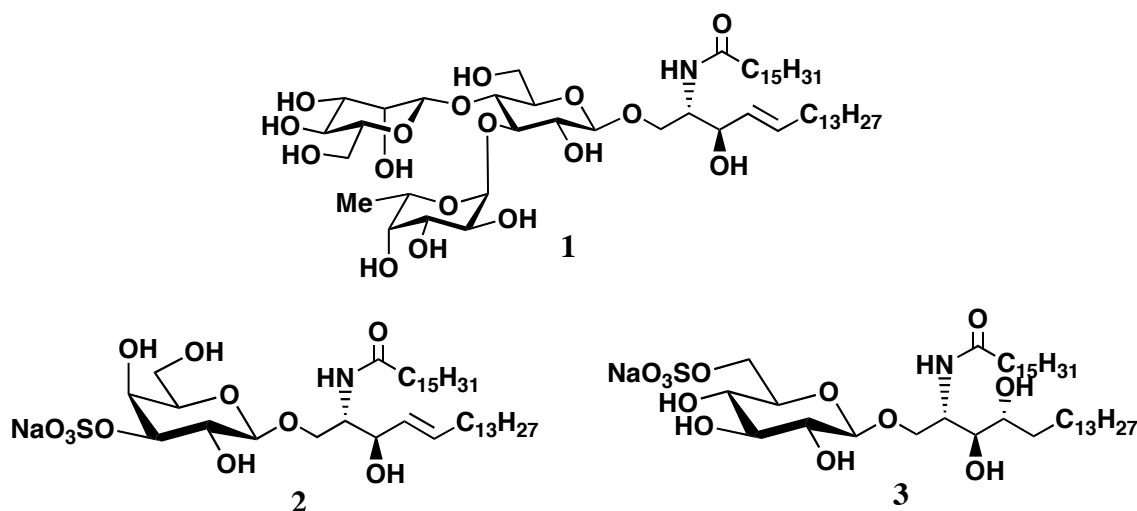
2) ネパール産プロポリス由来の薬剤排出トランスポーター阻害活性成分

がんや感染症における薬物療法において薬剤耐性は大きな問題となっている。我々はネパール産プロポリスおよびその基源であるマメ科植物 *Dalbergia sissoo* ROXB. 滲出物中に含有されるフラボノイドおよびフェニルプロパノイドの成分検索を行うとともに、

ABC トランスポーターである BCRP (Breast cancer resistance protein)発現細胞を用いたイリノテカンの代謝物(SN-38)の細胞増殖抑制を指標としてトランスポーター阻害活性について検討を行った。その結果、formononetin をはじめとした数種のフラボノイドにBCRP 阻害活性が認められた。

2. 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ヤスデ由来糖脂質**1**にメラノーマ細胞(B16F10)の増殖抑制及びFAK, Erkのリン酸化抑制が見いだされたことから、今回、*in vitro*で細胞の運動性、浸潤性の抑制を調べた。その結果、約40%で抑制した。一方、ガラクトースの3位に硫酸基が結合した糖脂質、スルファチドは様々な生物機能を有していることが報告されているが、近年、ホヤよりグルコースの6位に硫酸基のついた新規なスルファチドが単離され、我々はその合成を開始した。まず、既知のスルファチド**2**は、ガラクトシルセラミドを合成した後、3, 4位の水酸基をジブチルチンオキシドで架橋し、3位に選択的に硫酸基を導入して得た。次に、新規スルファチド**3**は、グルコシルセラミドを合成した後、水酸基の活性の違いを利用して6位に直接硫酸基を導入して得た。さらにキシヤヤスデ糖脂質同様メラノーマ細胞の増殖抑制及び運動性、浸潤性抑制効果を調べた結果、**2**が**1**と同程度の抑制を示したのに対して**3**には約70%の抑制活性があり、3種の糖脂質の中で最も活性が強かった。

キシヤヤスデ糖脂質**1**、スルファチド**2**、**3**は、細胞の増殖、生存に関連するシグナル分子であるFAK、Aktの活性化を抑制しており、この不活性化が増殖抑制、運動性、浸潤性の抑制に関与していると考えられる。



抗微生物薬の中枢神経系移行性と影響を与える因子の解明 ー中枢神経系副作用発現抑制の基盤としてー

慶應義塾大学実務薬学講座 木津純子

抗菌薬、とくに、ニューキノロン薬、カルバペネム薬によると考えられる痙攣発現が認められ、その回避法が注目されている。しかしながら、痙攣発現と薬物の構造・体内動態などとの関連性については、ほとんど検討されていないのが実状である。そこで、これらの抗菌薬による痙攣発現抑制の基礎的基盤の確立を目的として、以下の検討を行った。

1. ニューキノロン薬の痙攣誘発作用と構造活性相関

従来から、ニューキノロン薬の7位ピペラジニル基と痙攣誘発作用との関連性が指摘されている。今回、新規に開発・販売されたニューキノロン薬も含め、痙攣誘発作用と構造活性相関を検討した。

方法：マウス（ddY系、♂、5週齢）の脳室内にニューキノロン薬を投与し、痙攣誘発の有無を観察した。観察は、投与後30分間行った。

結果および考察：ニューキノロン薬は投与量依存的に、マウスに痙攣を誘発したが、tosufloxacinでは、500nmol/headまで痙攣の誘発を認めなかった。7位に遊離ピペラジニル基を有する化合物（norfloxacin, ciprofloxacin）では、強い痙攣誘発作用を示したが、7位ピペラジニル基を修飾することにより、また、ピペラジニル基以外の基を導入することにより、痙攣誘発作用は減弱した（図1）。これらの成績より、ニューキノロン薬の痙攣誘発と7位遊離ピペラジニル基との間に関連性のあることが示唆された。

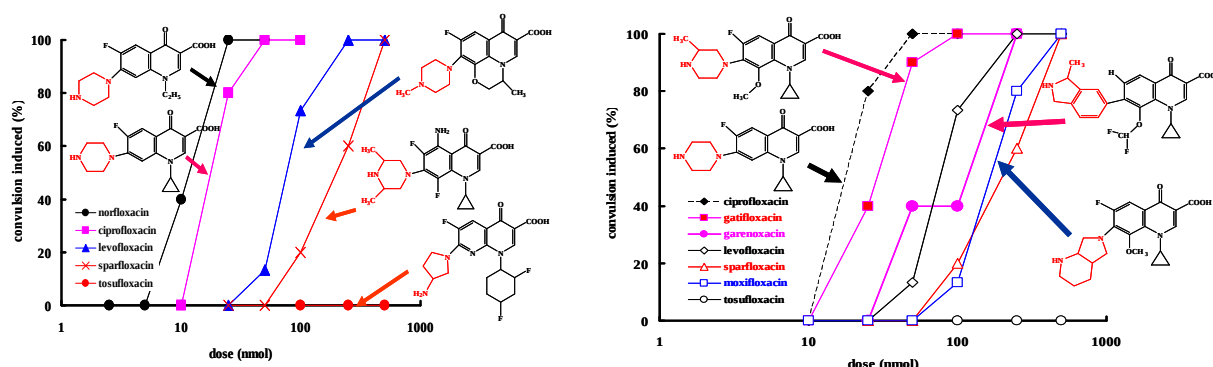


図1 脳室内投与によるキノロン薬痙攣誘発作用と構造活性相関

2. ニューキノロン薬の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響

近年、痙攣の発現における炎症性サイトカインの関与が考えられている（Vezzani A et al. Adv Exp Med Biol 2004 ; 548 : 123-33）。そこで、lipopolysaccharide (LPS) による炎症性サイトカイン産生に対するニューキノロン薬の影響について検討した。

方法：マウス（ICR、♂、6週齢）にLPS（5mg/kg）を投与し、血清中TNF- α 、IL-1 β 濃度を測定した。また、マウスより腹腔内マクロファージを調製し、LPS（5 μ g/mL）刺激によるTNF- α 、IL-1 β 産生に及ぼすニューキノロン薬の影響について検討した。

結果および考察：マウスにおけるLPS投与による血清中TNF- α 濃度の上昇は、10mg/kgのlevofloxacin投与により増強される可能性が示された。一方、LPS刺激によるIL-1 β 産生は、50mg/kgのnorfloxacin投与により増強される傾向が認められた。さらに、1mcg/mLのnorfloxacinでは、マクロファージにおけるIL-1 β 産生も上昇させる傾向が認められた（図2）。これらの成績より、炎症反応が中枢神経系に及ぶ状況では、これらの薬物は、炎症による痙攣誘発を増強する可能性が考えられた。

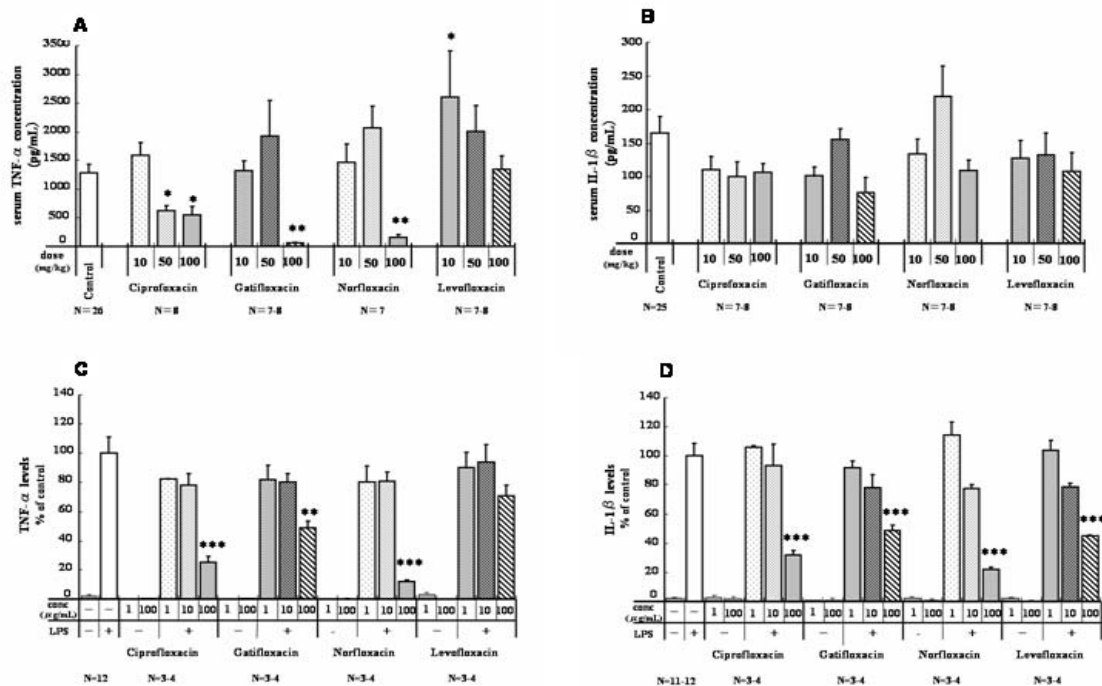


図2 マウスにおけるLPS投与によるTNF- α (A)およびIL-1 β 産生(B)および腹腔マクロファージにおけるLPS刺激によるTNF- α (C)およびIL-1 β (D)に及ぼすニューキノロン薬の影響

3. 発熱・非発熱時におけるニューキノロン薬・カルバペネム薬の体内動態

ニューキノロン薬・カルバペネム薬が痙攣を誘発する可能性を有することは良く知られている。これら抗菌薬は、感染症の治療として用いられており、臨床では発熱患者に投与されることが多い。そこで、発熱時・非発熱時のこれら抗菌薬の体内動態について検討した。

方法：乾燥酵母により発熱を誘発したマウスおよび非発熱マウスにおいて、ニューキノロン薬、カルバペネム薬の血清中濃度推移を、HPLCを用いて測定した。

結果および考察：発熱マウスでは、非発熱マウスに比べ、ニューキノロン薬のC_{max}増大，levofloxacin, norfloxacin, カルバペネム薬のT_{1/2}延長，ニューキノロン薬・カルバペネム系薬のAUCが増大することが明らかとなった(表1)。これらの成績より，発熱時にはC_{max}およびAUCの増大により，痙攣を起こしやすくなる可能性が示された。

表1 発熱時および非発熱時の抗菌薬体内動態パラメータ

	C _{max} (μ g/mL)		T _{1/2} (min)		AUC ₀₋₁₈₀ (μ g $\cdot$ min/mL)	
	非発熱時	発熱時	非発熱時	発熱時	非発熱時	発熱時
levofloxacin	9.0	11.7	10.2	28.0	348.0	714.7
norfloxacin	14.1	15.4	36.7	51.6	515.5	840.9
ciprofloxacin	2.4	3.3	88.5	86.8	238.1	356.9
gatifloxacin	9.7	12.2	43.6	38.4	653.8	834.3
meropenem	19.7	19.9	9.5	16.8	325.1	518.2
doripenem	24.8	19.9	11.5	21.2	495.0	645.2

以上の成績より，ニューキノロン薬ではその痙攣誘発作用と構造との関連性が示唆された。また，感染時には，炎症性サイトカインを変化させることにより，さらに，体内動態が変化することにより，痙攣が発現しやすくなる可能性も考えられた。