

博士學位論文

非ステロイド性抗炎症薬の慢性炎症時における
体内動態変動およびアシルグルクロン酸抱合体の
加水分解特性と毒性予測に関する研究

近畿大学大学院

薬学研究科薬科学専攻

生田博之

博士學位論文

非ステロイド性抗炎症薬の慢性炎症時における
体内動態変動およびアシルグルクロン酸抱合体の
加水分解特性と毒性予測に関する研究

令和5年1月12日

近畿大学大学院
薬学研究科薬科学専攻
生田博之

目次

序論	1
第 1 章 ラットにおける ibuprofen の体内動態に対する慢性炎症の影響	
第 1 節 緒言	10
第 2 節 実験材料および方法	13
1) 実験材料および動物	13
2) アジュバント関節炎ラットの作製方法	14
3) 動物実験	14
4) 血漿中 ibuprofen の定量法	15
5) ラット肝ミクロソームの調製法	15
6) Western blotting	16
7) CYP450 含量の測定	16
8) グルクロン酸抱合代謝活性の測定	16
9) タンパク結合実験	19
10) 血漿中総タンパクおよびアルブミン濃度の定量	20
11) 薬物速度論的解析	20
12) 統計解析	26
第 3 節 実験結果	27
1) アジュバンド投与後の浮腫率	27
2) 血漿中 ibuprofen の立体選択的体内動態に対するアジュバンド関節炎の 影響	29
3) Ibuprofen のキラル変換に対するアジュバンド関節炎の影響	33
4) グルクロン酸抱合活性および CYP450 含量へのアジュバンド関節炎の影響	40
5) Ibuprofen タンパク結合に対するアジュバンド関節炎の影響	42
第 4 節 考察および小括	45
第 2 章 ラット肝ミクロソームにおける NSAID-アシルグルクロン酸抱合体の生成・ 分解特性と特異体質性毒性リスクとの関連性	
第 1 節 緒言	52
第 2 節 実験材料および方法	57
1) 実験材料および動物	57
2) ラット肝ミクロソームの調製法	58
3) ラット肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の生成と分解実験 ..	58

4) NSAIDs およびアシルグルクロン酸抱合体の定量法	59
5) 薬物速度論的解析	61
第3節 実験結果	63
1) ラット肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の生成と消失の 経時変化	63
2) アシルグルクロン酸抱合体量と特異体質性毒性リスクとの関連性	66
3) ラット肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の生成と消失の 速度論的パラメーター	68
第4節 考察および小括	70
第3章 ヒトおよびラット肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の 加水分解の種差	
第1節 緒言	76
第2節 実験材料および方法	79
1) 実験材料	79
2) 肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の加水分解実験	79
3) 肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の加水分解に対する β -glucuronidase および esterase の寄与	80
4) NSAIDs の定量法	80
5) 薬物速度論的パラメーターの算出	82
6) 統計解析	82
第3節 実験結果	83
1) ヒトおよびラット肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の加水 分解	83
2) ヒトおよびラット肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の加水 分解に対する β -glucuronidase および esterase の寄与	86
第4節 考察および小括	89
総括	94
引用文献	100
略語一覧表	115
謝辞	

序論

薬物は酵素や受容体に結合することで、生体内で分子レベルの変化を引き起こし疾患の治療や症状の緩和に働く。本来、薬物は適正に使用すれば有用であるが、副作用を惹起する場合がある。薬物が医薬品として承認されるまで、非臨床試験、臨床試験では副作用・毒性発現が認められなかったにもかかわらず、市販後に初めて重篤な薬疹、肝障害、心毒性、血液・骨髄毒性、アレルギー反応などの毒性が発現することがある。このような副作用は特異体質性薬物毒性 (IDT; idiosyncratic drug toxicity)と総称され、発生頻度は非常に稀であり一般に 5,000～10,000 人に 1 人あるいはそれ以下と発現率が低く、既知の薬理作用とは無関係な毒性で、用量反応性はないとされている。2013～2015 年に実施された新薬開発の臨床試験段階における開発中止理由の最大の要因は約 50%を占める有効性に起因する事例であるが、それに次ぐ約 25%が副作用・毒性発現に起因する [1]。特に薬物誘発性肝障害 (DILI; drug-induced liver injury)の発症は副作用・毒性発現に起因する臨床試験中止の主たる原因として知られている [2]。現在臨床で用いられている薬物の中でも、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs; non-steroidal anti-inflammatory drugs)の diclofenac (DIC), マクロライド系抗菌薬の erythromycin や β -ラクタム系抗菌薬の flucloxacillin などは重篤な肝障害による死亡例や肝移植が報告されている [3]。DILI は、薬物の用量依存的に肝障害を示す「中毒性肝障害」と、用量や薬理作用に非依存的で、薬物自体の要因 (e.g. 化学構造, 投与量, 体内動態)に加え、個人の特異体質や遺伝的要因 (e.g. 薬物代謝酵素, 受容体, トランスポーター)および環境的要因 (e.g. 食事, 喫煙, 疾患)により発症する「特異体質性肝障害」に分類される [4]。中毒性肝障害の最も典型的な例として、解

熱鎮痛薬の一種である acetaminophen (APAP)による肝障害が挙げられる。米国においては、急性肝障害の原因の約 50%は自殺目的で APAP を過剰に服用したことに起因する [5]。したがって、中毒性肝障害については薬物を適正使用する限りはほとんど問題とならない。一方で特異体質性肝障害は前述の理由により、薬物を適正使用していても惹起する可能性があるために発症予測が非常に困難である。特に新薬開発過程においては少数の健常者や患者を対象とする第 I 相や第 II 相臨床試験では起こらなかった肝障害が、多数の患者を対象とした第 III 相臨床試験や、上市後に一般患者に広く投与されて初めて惹起され、結果として開発中止や市場撤退に至る場合がある。したがって、特異体質性肝障害を含む IDT は製薬企業にとっては経済上の理由から、臨床現場では安全上の理由から早期の発症予測が求められてきた。しかし、IDT の発症機序はいまだに完全には解明されておらず、早期の発症予測は困難である。

肝臓は薬物代謝を担う主要臓器であり、投与された薬物の多くは、肝臓において cytochrome P450 (CYP)により第 I 相反応の酸化反応や UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT; UDP- glucuronosyltransferase)などの各種抱合酵素により第 II 相反応のグルクロン酸抱合やグルタチオン抱合を受けた後、尿中や胆汁中に排泄される (Fig. 1)。臨床で使用されている薬物の消失経路は、肝代謝が全体の約 70% を占め、薬物代謝を担う酵素としては、CYP が約 70%、UGT が約 15%を占め、ついで esterase が続く [6]。CYP は肝臓に最も多く発現し、小腸、腎臓、肺などすべての臓器に存在している。CYP には様々な分子種が存在するが、ヒトでは薬物代謝には CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 および CYP3A4 が主に関与すると報告されている [7]。UGT は小胞体膜タンパク質であり、UGT1A, UGT2A およ

び UGT2B サブファミリーに分類され [8], ヒトでは 19 種の機能的分子種が同定されている [9]。主として肝臓, 腎臓, 小腸に多く発現し, 脳にも発現している [10, 11]。UGT によるグルクロン酸抱合は, 水酸基やカルボキシ基などの官能基を有する薬物や代謝物を基質とし, それぞれエーテル型グルクロン酸抱合体とエステル型グルクロン酸抱合体を生成し, さらに極性が増加することにより速やかに, 体外に排泄されるため, 薬物代謝反応は一般的に解毒機能として働く。

一方, 代謝反応の結果, 化学的に不安定な反応性代謝物を生成する薬物もあり, 多くの DILI の発症には薬物の肝代謝の結果として生じる化学的に不安定で反応性に富む反応性代謝物が寄与することが知られている (Fig. 1)。反応性代謝物は, 核酸や細胞構成タンパク質などの生体内分子に共有結合し, protein adduct (タンパク付加物)を形成することにより, ミトコンドリア機能障害, 胆汁酸排泄阻害, 細胞ストレスなどを介して細胞毒性を発現する。特に, カルボキシ基を有する薬物がグルクロン酸抱合された結果として生じるエステル型のアシルグルクロン酸抱合体 (AG; acyl glucuronide)は, 反応性代謝物の一つとして知られている。米国食品医薬品局 (FDA)より発出された「Safety Testing of Drug Metabolites (MIST ガイダンス)」において, 代謝物の安全性評価について考え方が示されており, 生成する代謝物が AG である場合には, 医薬品開発の段階で安全性評価の検討や追加の安全性評価が必要とされる [12]。事実, AG は, 化学的に非常に不安定で酸化ストレスやミトコンドリア障害により直接的に細胞を障害することが報告されている [13, 14]。また, AG は生体内のタンパク質と共有結合することで, タンパク質の機能を阻害したり, 免疫応答を惹起することが報告されている [15]。

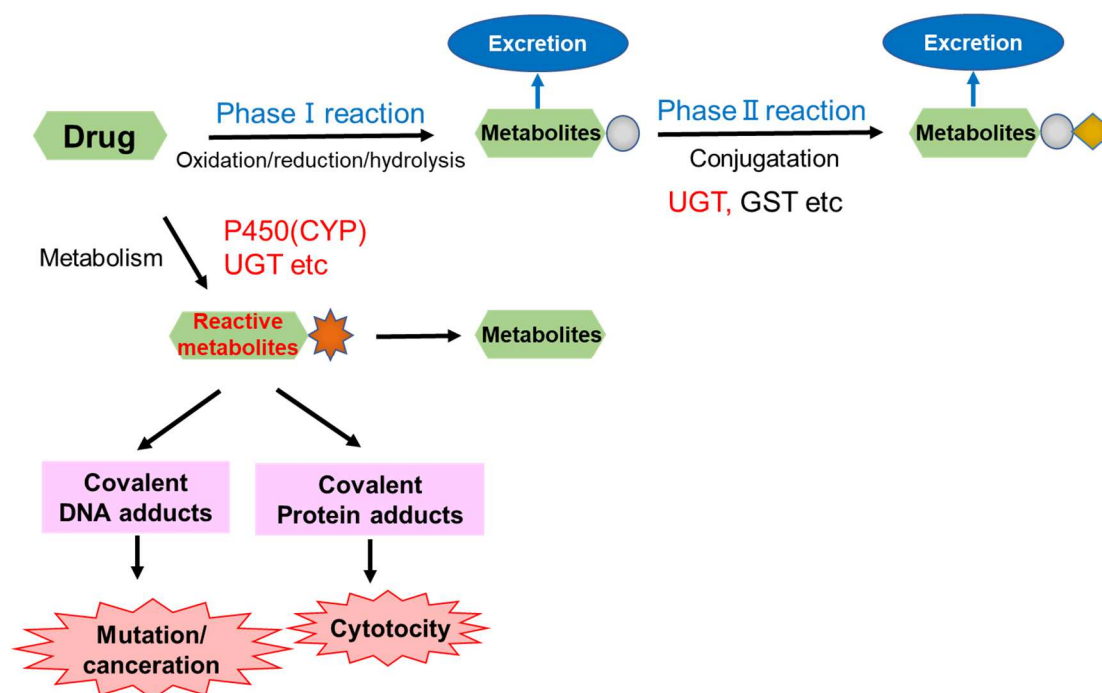


Fig. 1. Drug metabolism and reactive metabolites

カルボキシ基を有する NSAIDs は、cyclooxygenase (COX)阻害により主に胃腸障害や腎障害、出血傾向が副作用として挙げられるが、特異体質性肝障害を発症する場合がある。DILI のうち約 12.6%は NSAIDs 服用に起因し、臨床型としては、肝炎型 50.0%、胆汁うっ滞型 14.9%、混合型 32.2%、劇症肝炎 2.9%と報告されている [16]。Ibuprofen (IBF)や zomepirac (ZOM)などのように IDT により市場撤退となった例もあり、医薬品開発や臨床上問題となっている [1, 17]。NSAIDs 誘発性特異体質性毒性の発生機序の詳細は明らかにされていないが、肝臓における反応性代謝物である AG 生成を介することが一因であるといわれている。生体内で AG はグルクロン酸の 1 位水酸基に薬物分子がエステル結合した、1-O- β -AG として産生される (Fig 2)。生成した 1-O- β -AG のエステル結合部分は化学的に非常に不安定であり、水溶液中では速やかに親薬物に加水分解される他、アシル基が分子内転移することにより 2 位、3 位および 4 位水酸基に薬物分子がエ

ステル結合した位置異性体 (regioisomer)を生成する。1-O-β-AG およびその位置異性体はタンパク質との共有結合体形成を介して IDT 発症に寄与すると考えられている [18]。したがって、水溶液中における 1-O-β-AG の加水分解や分子内転移による消失は AG の化学的不安定さの指標として IDT リスクの評価に用いられてきた [19]。また、DILI を発症しやすい薬物の特徴として一日最大用量が 100 mg 以上かつ脂溶性が高い ($\log P \geq 3$)薬物が挙げられている [20]。これまで、リン酸緩衝液中における AG の化学的不安定さと、一日最大用量を組み合わせることで IDT リスク評価が試みられ、IDT リスクが添付文書で警告されていない市販薬と、IDT リスクが警告されている市販薬および市場撤退した薬を判別できることが報告されている [19]。しかし、IDT リスクが警告されている市販薬と市場撤退した薬物群の判別はこれまで実現しておらず、AG の化学的不安定さだけでは特異体質性毒性が惹起される理由が説明できない。したがって、化学的不安定さ以外にも様々な手法により AG を介した毒性の評価方法がこれまでに試みられてきたが、IDT リスクの予測には AG の物理化学的性質に加え生体側の因子を考慮することが必要不可欠であると考えられる。

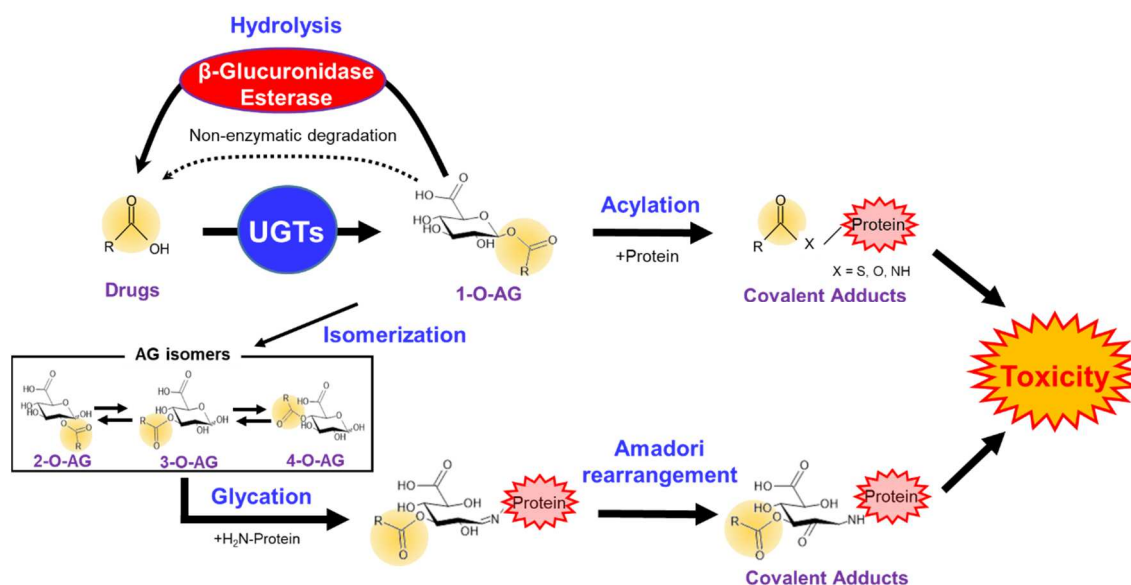


Fig. 2. Schematic mechanism of acyl glucuronide-mediated drug toxicity

これまでに AG は、リン酸緩衝液中で半減期が短い AG ほど共有結合体を生成しやすいことがわかっており [21], 加水分解と共有結合体生成の相関性において AG-ジアステレオマー間の立体選択性も報告されている [22]。また, Iwaki らのグループでは, 肝ミクロソーム中で AG を生成しやすい NSAIDs ほどタンパク質と共有結合体を形成しやすいことや [23], 肝細胞内への AG の蓄積量がタンパク質共有結合体生成量や細胞毒性の強さと相関することを明らかにしてきた [24]。したがって AG の体内および細胞内への蓄積は IDT の原因の一つと考えられる。

生体内で AG は, β -glucuronidase や esterase の一種である a/b hydrolase domain containing 10 (ABHD10) や acylpeptide hydrolase (APEH) により組織中で加水分解されること [25, 26], さらにマウスでは esterase 阻害条件下で ZOM-AG の腎蓄積量が顕著に増加し, 腎障害が惹起されることが知られており [27], 加水分解酵素

による AG の分解は組織における AG の消失に重要な役割を果たしている可能性がある。特に、肝臓や腎臓における β -glucuronidase の発現量は個体差が大きい
ため [28, 29], 加水分解酵素による分解されやすさは IDT との関連が疑われる。
しかし, AG 加水分解特性と IDT との関係性はいまだに不明である。

NSAIDs のうち, ibuprofen (IBU) や ketoprofen (KET) などの 2-アシルプロピオン酸系抗炎症薬 (2-APA) には, 2 位の不斉炭素に基づく対掌体 (エナンチオマー) があり, エナンチオマー間で薬理作用あるいは代謝, 排泄など生体内動態に差異が認められる [30-32]。2-APA は臨床では naproxen (NAP) を除いてほとんどがラセミ体として使用されているが, 抗炎症作用および消化管障害作用は主に *S*-体に寄因し, *R*-体には薬効がほとんど認められない [33]。NAP が *S*-NAP のみとして市販されているのは, *R*-NAP が肝毒性を引き起こし望ましい薬理活性の大部分が *S*-NAP に存在するためである [34]。2-APA の体内動態において特徴的なことは, 生体内で光学異性化 (キラル変換) が起こることである [35-37]。キラルあるいはラセミ体の薬物では, *R*-体および *S*-体の親薬物から生成する AG のジアステレオマー間ではタンパク質との共有結合体の形成に差異があり, ジアステレオマー間で免疫毒性に違いがある可能性がある。たとえば, *R*-NAP-AG は, *S*-NAP-AG よりタンパク質との共有結合を形成しやすい [22]。したがって, キラル変換により *R*-体と *S*-体の存在比の変動は, 2-APA の薬効および毒性発現に大きく影響すると考えられる。多くの 2-APA において薬理的に不活性な *R*-体から活性な *S*-体に一方的なキラル変換が認められているが [36, 38-44], この反応には基質特異性および種差があり, 化合物によっては方向性が異なる場合も存在する [45-47]。NSAIDs は, COX を阻害し, プロスタグランジン類の合成を抑制する

ことから、解熱鎮痛、抗炎症作用を有し、関節痛や術後の疼痛などの慢性疼痛の治療を目的に汎用される。しかし、炎症反応が 2-APA のキラル変換に与える影響は不明である。

以上の背景から、第 1 章では、*R*-体から *S*-体に一方向にキラル変換する IBU をモデル薬物として選択し、IBU の立体選択的体内動態ならびに薬効や毒性発現に大きく影響するキラル変換に対する慢性炎症の影響を明らかにすることを目的とした。慢性炎症の動物モデルであるアジュバンド関節炎 (AA) ラットに *rac*-IBU, *R*-IBU, *S*-IBU を静脈内投与し、*R*-IBU と *S*-IBU の薬物動態に及ぼす炎症の影響を検討した。これらの結果から、AA ラットは *R*-IBU および *S*-IBU の薬物動態を立体選択的に変化させること、薬理不活性な *R*-IBU から薬理作用を有する *S*-IBU へのキラル変換率への AA の影響は、ほとんどないことが確認された。

第 2 章では、AG の化学的不安定さに加え、種々の NSAIDs の肝臓における AG の生成・分解の速度論的解析を行い、IDT リスクとの関連性の有無を明らかにすることを目的とした。ラット肝ミクロソームにおける AG の生成、酵素による加水分解、化学的不安定性を評価し、IDT リスクとの関連性を検討した。本検討では、NSAIDs を IDT リスクの観点から、毒性の強さにより市場撤退 (Withdrawn, WDN)群、警告 (Warning, WA)群、および安全 (Safe, SA)群の 3 つのカテゴリに分類した。AG の生成および非酵素的分解速度定数は WDN 群、WA 群および SA 群で有意な差は認められなかったが、WDN 群の酵素的分解速度定数は WA 群および SA 群より大きい傾向が認められた。今回、肝ミクロソームで AG を生成することにより、AG の酵素分解性および化学的不安定性を同時に評価するこ

とができた。本方法により、AG を調製することなく AG の分解を評価することが可能となった。さらに、ラット肝マイクロソームにおける AG の酵素的分解と IDT リスクとの関係を明らかにした。

第3章では、IDT リスクの高い薬物の AG がラット肝マイクロソーム中で加水分解されやすいことが明らかとなったため、ヒトおよびラット肝マイクロソーム (HLM; human liver microsomes および RLM; rat liver microsomes) の AG 加水分解における種差を明らかにすることを目的とした。HLM および RLM における AG 加水分解特性、および AG 加水分解に対する β -glucuronidase および esterase の寄与を評価するために種々の NSAID-AGs を用いて検討した。HLM では esterase が AG 加水分解酵素として優位に寄与していたが、RLM では β -glucuronidase と esterase の両方が AG 加水分解に同等に寄与していた。一方で、MEF-AG と ETO-AG は β -glucuronidase によってのみ加水分解されることが明らかとなった。これらの結果から、NSAID-AG に対する AG 加水分解酵素の活性がヒトとラットで異なることを明らかにした。

第 1 章 ラットにおける ibuprofen の体内動態に対する慢性炎症の影響

第 1 節 緒言

臨床で広く用いられている ibuprofen (IBU) や ketoprofen (KET) などの 2-アリルプロピオン酸系抗炎症薬 (2-APA) には 2 位の不斉炭素に基づくエナンチオマーが存在し、臨床では naproxen (NAP) を除いてほとんどがラセミ体として使用される。エナンチオマー間で薬理作用あるいは代謝、排泄など生体内動態に差異が認められ [30-32]、抗炎症作用および消化管障害作用は主に *S*-体に寄因する [33]。NAP が *S*-NAP のみとして市販されているのは、*R*-NAP が肝毒性を引き起こし望ましい薬理活性の大部分が *S*-NAP に存在するためである [34]。2-APA はヒトおよび動物の生体内でキラル変換が起こり [35-37]、基本的には薬理的不活性な *R*-体から活性な *S*-体に一方的にキラル変換される [36, 38-44]。たとえば、Fig. 3 に示すように IBU のキラル変換は *R*-体がアシル CoA 合成酵素 (ACS) による CoA チオエステル化および 2-アリルプロピオニル CoA エピメラーゼ (APCE) を介して異性化する一方、*S*-体は ACS の基質とならないため異性化しない [43, 48, 49]。ラセミ体の薬物では、*R*-体および *S*-体の親薬物から生成するアシルグルクロン酸抱合体 (AG) のジアステレオマー間ではタンパク質との共有結合体の形成に差異があり、ジアステレオマー間で免疫毒性に違いがある可能性がある。生理的条件下 (pH7.4, 37°C) におけるヒト血清アルブミンとの共有結合体の形成量は *R*-NAP-AG の方が *S*-NAP-AG より多い [22]。また、*in vitro* において fenoprofen-AG の *R*-体は *S*-体と比較してヒト血漿タンパク質と著しく共有結合するが、*in vivo* では共有結合体形成量は逆転する [50]。これは、*R*-fenoprofen がヒトでは著しいキラル変換を起こし、*S*-fenoprofen と

その AG 量が *R*-fenopfen よりも生体内で増加するためである。したがって、生体内でのキラル変換により *R*-体と *S*-体の存在比の変動は、2-APA の薬効や毒性発現に大きく影響すると考えられる。2-APA 自身の立体選択的薬物動態はすでに多くの報告 [51-57]があるが、炎症発症時における薬物のキラル変換への影響はほとんど知られていない。

アジュバント関節炎 (AA)ラットはヒトのリウマチ性関節炎と臨床症状および病理学所見が類似しているといわれており [58]、慢性炎症の有用な実験モデルとして広く一般的に使用されている。AA ラットでは健常ラットと比較して、propranolol [59 , 60], acebutolol [61], cyclosporine [62]などの薬物の血中からの消失が遅延する。これは、血漿中アルブミンへの結合の変化ならびに CYP450 および UGT などの肝臓中酵素活性の変化が原因だと考えられる [63-65]。ほとんどの 2-APA は血漿アルブミンとの結合性が高く、主に肝代謝により排出される。Meunier らは、AA ラットでの KET の立体選択的なグルクロン酸抱合を報告し [65]、AA ラットは、*in vivo* で KET のグルクロン酸抱合能が著しく低下することを明らかにした [66]。このことから、AA ラットでは肝ミクロソーム中の酵素活性が抑制されていると考えられ、キラル変換に関わる酵素も変化している可能性がある。

本章では、*R*-体から *S*-体に一方向にキラル変換する IBU をモデル薬物として選択し、IBU の立体選択的体内動態ならびにキラル変換に対する慢性炎症の影響を AA ラットを用いて検討した。

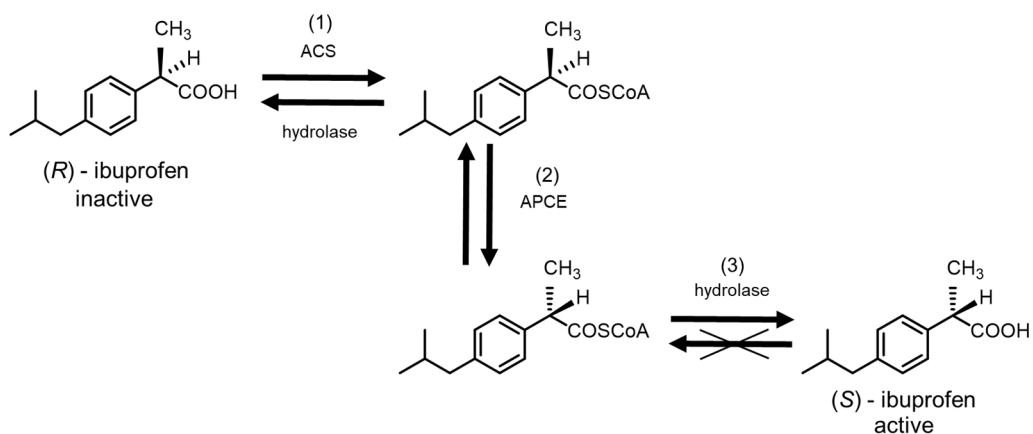


Fig. 3. Mechanism of metabolic stereoisomeric inversion of ibuprofen

(1) the activation process from *R*-IBU to *R*-IBU-CoA thioester via an adenylate intermediate by acyl-CoA synthetase (ACS), (2) the racemization process of *R*-IBU-CoA thioester by 2-aryl propionyl-CoA epimerase (APCE), and (3) the process of release of free *S*-IBU by hydrolysis enzyme. *S*-IBU does not form the coenzyme A thioester.

第2節 実験材料および方法

1) 実験材料および動物

IBU のラセミ体 (*rac*-IBU)は和光純薬工業株式会社 (大阪)より購入した。IBU の *R*-エナンチオマー (*R*-IBU)はフナコシ株式会社 (東京)より, *S*-エナンチオマー (*S*-IBU)は東京化成工業株式会社 (東京)より購入した。IBU の誘導化に用いた *R*-(+)- α -phenylethylamine は東京化成工業株式会社より購入した。UDP- glucuronic acid (UDPGA)はナカライテスク株式会社製 (京都) を使用した。高速液体クロマトグラフィ (HPLC)の内部標準物質 (I.S.)として用いた etodolac (ETO)および *S*-naproxen (NAP)はそれぞれ日本新薬株式会社 (京都)と Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA) から購入した。AA ラットの作製に用いた *Mycobacterium butyricum* は Difco, Inc. (Detroit, MI, USA)より購入した。Rabbit polyclonal anti-acyl-coenzyme A synthetase (ACS)1 antibody は Bioss, Inc. (Woburn, MA, USA)より, rabbit polyclonal anti-2-aryl propionylcoenzyme A epimerase (APCE) antibody は Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA) より, mouse monoclonal anti- β -actin は Acris Antibodies, Inc. (Herford, Germany)より購入した。他の試薬はすべて試薬特級品または HPLC 用試薬を使用した。

実験動物には7~9週齢の Sprague-Dawley (SD)系雌性ラット(体重 200~300 g, 日本クレア株式会社, 東京)を使用した。動物は $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$ の条件下で飼育し, 照明は 12 hr 毎 (明期: 午前7時~午後7時)に点灯, 消灯して実験まで固形試料 (MF, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京)および水を自由に与えた。本

論文に含まれるすべての実験動物は近畿大学に承認された「近畿大学実験動物規定」に従って行った。

2) アジュバント関節炎ラットの作製方法

常法により AA ラットを作製した [67]。雌性 SD 系ラットの右後肢足蹠および尾に Bayol F に懸濁した *Mycobacterium butyricum* (10 mg/mL) を各 0.05 mL 皮内投与し、AA ラットを作製した。コントロールラットには Bayol F のみを 0.05 mL 同様に皮内投与した。AA の発症は足蹠浮腫率により評価し、*Mycobacterium butyricum* 投与後 21 日目のラットを実験に用いた。

3) 動物実験

薬物の投与および採血のために、頸静脈カニューレーションは薬物投与前日にラットを pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) で麻酔し、Upton の方法に準じて [68]、頸静脈にシリコンチューブ (SH No.00, 内径 0.5×外径 1.0 mm, 富士システムズ株式会社, 東京) を挿入した。また、胆管カニューレーションは薬物投与当日にラットを urethane (1 g/kg, i.p.) で麻酔し、常法により胆管にポリエチレンチューブ (PE10, 内径 0.28×外径 0.61 mm, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を挿入した。胆管カニューレーションは、IBU の腸肝循環の影響を除くために行った [69]。

Rac-IBU 20 mg/kg または各エナンチオマー 10 mg/kg を静脈内投与後、血液を頸静脈カニューレーションチューブから経時的 (1, 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 min) に 200 μ L ずつ採取し、直ちに 13,000 rpm で 45 sec 遠心分離した。その上清 90 μ L を 17%

リン酸 5 μL と混和後、ドライアイスで急速冷凍した。得られた血漿は分析まで -80°C に保存した。

4) 血漿中 ibuprofen の定量法

IBU はキラルカラムを用いる HPLC 法により、*R*-および *S*-IBU を立体選択的に測定した。すなわち、血漿 90 μL に methanol に溶解した I.S. (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NAP) 50 μL , acetate buffer (pH 2.5) 400 μL および ethyl acetate 2 mL を混和した (140 rpm, 10 min)。ついで、その混液を 3,000 rpm で 5 min 遠心分離し、上清を蒸発乾固した。残渣を移動相 100 μL に溶かし HPLC 用の試料とした。カラムは CHIRAL OJ-R (4.6 \times 150 mm, 5 μm 粒子径, 株式会社ダイセル, 大阪) を用い、移動相に 0.2 M phosphate buffer (pH 2.0)/acetonitrile = 67.5 : 32.5 (v/v) を使用した。カラム温度は 35°C , 測定波長は UV 220 nm, 移動相流速は 1.0 mL/min で行った。HPLC の装置は LC-6A (株式会社島津製作所, 京都), 検出器は UV 検出器 SPD-10A (株式会社島津製作所) を用いた。移動相はすべてポアサイズ 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過後使用した。

5) ラット肝ミクロソームの調製法

肝ミクロソームは、以下の常法に従い調製した。ラットの肝を氷冷した生理食塩水で洗浄し血液を除いた後、4 倍量の冷 1.15 % KCl を加えホモジナイザー (株式会社日立ハイテク, 東京) を用いてホモジナイズした。ホモジネートを 12,000 $\times g$, 4°C で 25 min 遠心分離し、得られた上清をさらに 105,000 $\times g$ で 60 min 遠心分離を 2 回行い、得られたミクロソーム画分を 1.15% KCl に懸濁させて実験に供した。

6) Western blotting

コントロールおよびAA ラットの肝ミクロソーム, 7.5% e-Pagell (アトー株式会社, 東京) を用いて SDS -polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE)を行い, 1 well あたり 50 μ g のミクロソームを得た。分離したタンパク質は, Hybond-P polyvinylidene difluoride 膜 (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA)に転写した。抗体と ECL Prime Western Blotting Detection system (GE Healthcare)を用いて, 免疫反応性の ACS1, APCE および β -actin を検出した。

7) CYP450 含量の測定

ラット肝ミクロソーム中 CYP450 含量の測定は Omura らの方法を用いて行った [70]。差スペクトルの測定は V-560 型紫外可視分光光度計 (日本分光株式会社, 東京)を用いて測定した。

8) グルクロン酸抱合代謝活性の測定

Rac-IBU 1 mM を肝ミクロソーム (10 mg protein/mL)中 37°Cでインキュベートし, 10 min 後に生成した AG を測定した。反応液の組成は Table 1 のとおりである。反応により生成した AG の測定は, 反応停止後に反応液を 50 μ L 採取し, 直ちに acetonitrile 50 μ L, 移動相溶液 250 μ L を加え, 12,000 rpm で 10 min 遠心分離し除タンパクした後, 上清 100 μ L に methanol に溶解した I.S. (5 μ g/mL ETO) 50 μ L を混和し, HPLC 用の試料とした。HPLC 条件として, カラムは Cosmosil 5C18-ARII (4.6 \times 250 mm, 5 μ m 粒子径, ナカライテスク株式会社)を用い, 移動相は 2 mM tetra-n-butylammonium hydrogensulfate を含む acetonitrile/0.05 M リン酸緩衝液(pH 5.5) = 35 :

65 (v/v) を使用した。カラム温度 35°C, 測定波長は UV 232 nm, 移動相流速は 1.0 mL/min で分析した。HPLC 装置は 4) と同様の装置で行った。なお, グルクロン酸抱合活性は単位時間 (min) あたりのタンパク質 1 mg につき生成した抱合体量 (nmol) として算出した。

Table 1. Reaction medium components for glucuronidation

	Volume	Final Conc.
Water	100 μ L	-
0.5 M MgCl	20 μ L	10 mM
4% Triton X-100	50 μ L	0.2%
0.1 M PMSF/EtOH	20 μ L	2 mM
0.4 M D-1, 4-Saccharolactone	50 μ L	20 mM
1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4)	100 μ L	100 mM
Microsome (20 mg/mL)	500 μ L	10 mg/mL
0.1 M UDPGA	100 μ L	10 mM
16.67 mM IBU	60 μ L	1 mM
	Total 1 mL	

9) タンパク結合実験

IBU の *in vivo* タンパク結合は限外ろ過法により測定した。コントロールおよび AA ラットに *rac*-IBU 20 mg/kg を静脈内投与後, heparin sodium injection (1,000 units/ml) 150 μ L をあらかじめ入れた注射筒にラットの腹部大動脈 6 mL 採血し, 2,000 rpm で 10 min 遠心分離し, 血漿を得た。血漿 500 μ L を MINICENT-10 (東ソー株式会社, 東京)を用いて 6,000 rpm で 10 min 遠心分離し, ろ液中のタンパク非結合型 IBU を定量した。別に全血漿中濃度 (結合型+非結合型)を測定した。各エナンチオマーの非結合型濃度は限外ろ過後, ろ液中の各エナンチオマーに *R*-(+)- α -phenylethylamine を以下の方法で結合させ, ジアステレオマーとすることで通常の逆相 HPLC カラムで立体選択的に測定した [71]。また, *in vitro* タンパク結合は, IBU を投与していないコントロールおよび AA ラットの血漿 594 μ L と methanol に溶解した IBU (5 mg/mL) 6 μ L を混和し (最終 IBU 濃度 50 μ g/mL), 37°C で 10 min インキュベート後, 限外ろ過後に *in vivo* タンパク結合と同様に測定した。

血漿 100 μ L に methanol に溶解した I.S. (1 μ g/mL NAP) 50 μ L, 0.6 M sulfuric acid 200 μ L および isooctane/isopropanol = 95 : 5 (v/v) 3 mL を混和し, ボルテックスミキサーにて 30 sec 攪拌した。ついで, その混液を 3,000 rpm で 5 min 遠心分離し, 有機層を別のチューブに移し, 蒸発乾固した。残渣に acetonitrile に溶かした 50 mM triethylamine 200 μ L および acetonitrile で調製した 6 mM ethyl chlorocarbonate 50 μ L を加えボルテックスミキサーで 30 sec 攪拌した。さらに, 0.5 M *R*-(+)- α -phenylethylamine 溶液を 50 μ L 加え, ボルテックスミキサーで攪拌し静置した。2 min 後に 0.25 M HCl を 1 mL, chloroform 3 mL を加えてボルテックスミキサーで 30 sec

攪拌した。水層を吸引除去し、残った有機層を蒸発乾固した。残渣を移動相 200 μ L に溶かし HPLC 用の試料とした。

カラムは Inertsil ODS-3 (4.6 \times 100 mm, 5 μ m 粒子径, GL Sciences)を用い、カラム温度は 25 $^{\circ}$ C, 測定波長は UV 225 nm, 移動相流速は 1 mL/min で行った。移動相に acetonitrile/water/acetic acid/triethylamine = 55 : 45 : 0.1 : 0.03 (v/v) (pH 5.0)を使用した。HPLC の装置は 4)と同様の装置を用いた。

10) 血漿中総タンパクおよびアルブミン濃度の定量

コントロールおよび AA ラットの腹部大動脈から 6 mL 採血し、37 $^{\circ}$ Cで 30 min インキュベートした。その後、2,000 rpm で 10 min 遠心分離し、血漿を得た。血漿中の総タンパクおよびアルブミンは、多項目自動分析装置オリンパス AU5200 を用いて測定した。

11) 薬物速度論的解析

薬物速度論的パラメーターはノンコンパートメント解析法およびキラル変換を考慮したコンパートメントモデルにより WinNonlin software (Pharsight, Mountain View, CA, USA) を使用して算出した。

ノンコンパートメント解析法による各パラメーターの計算式は以下のとおりである。

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda_z} \quad (1)$$

$$CL_{tot} = \frac{Dose}{AUC_{0-\infty}} \quad (2)$$

$$MRT = \frac{AUMC_{0-\infty}}{AUC_{0-\infty}} \quad (3)$$

$$Vd_{ss} = \frac{Dose \cdot AUMC}{(AUC_{0-\infty})^2} \quad (4)$$

ここで, $T_{1/2}$ は半減期, λ_z は血中濃度時間曲線の末端消失相における消失速度定数, CL_{tot} は全身クリアランス, Vd_{ss} は定常状態における分布容積, MRT は平均体内滞留時間を表す。また, $AUC_{0-\infty}$ および $AUMC_{0-\infty}$ は, それぞれ無限大時間までの血漿濃度時間曲線下面積および 1 次モーメント曲線下面積である。なお, $AUC_{0-\infty}$ および $AUMC_{0-\infty}$ は最終採血時間まで台形法により計算し, 最終採血時間以降は $AUC_{n-\infty} = C_n/\lambda_z$, $AUMC_{n-\infty} = (t_n \cdot C_n)/\lambda_z + C_n/\lambda_z^2$ で計算した。

キラル変換を考慮したコンパートメントモデルによる解析法は以下のとおりである。IBU 血漿中濃度経時変化は, Fig. 4 に示すように R-IBU から S-IBU への一方向の変換過程を含む 2-コンパートメントオープンモデルを構築し, 物質収支式を Runge-Kutta-Gill 法による数値積分を用いた同時あてはめにより解析した。

Fig. 4 より S-IBU 静脈内投与後の S-IBU 血漿中濃度経時変化は, 次式の微分式で表される。

$$V_{1(S)} \cdot \frac{dC_{1(S)}}{dt} = -(k_{10(S)} + k_{12(S)}) \cdot V_{1(S)} \cdot C_{1(S)} + k_{21(S)} \cdot X_{2(S)} \quad (5)$$

$$\frac{dX_{2(S)}}{dt} = k_{12(S)} \cdot X_{1(S)} - k_{21(S)} \cdot X_{2(S)} \quad (6)$$

ここで, $C_{1(S)}$ は血液コンパートメントにおける S-IBU 全 (結合型 + 非結合型) 血漿中濃度である。 $V_{1(S)}$ は, 血液コンパートメントの分布容積を示す。 $X_{1(S)}$ および $X_{2(S)}$ は,

それぞれ血液および組織コンパートメントにおける **S-IBU** の薬物量である。 $k_{10(S)}$, $k_{12(S)}$ および $k_{21(S)}$ は 1 次速度定数を表す。

また, **R-IBU** 静脈内投与後の **R-IBU** および **S-IBU** 血漿中濃度経時変化は, 次式のように表される。

$$V_{1(R)} \cdot \frac{dC_{1(R)}}{dt} = -(k_{0(R)} + k_{12(R)} + k_{RS}) \cdot V_{1(R)} \cdot C_{1(R)} + k_{21(R)} \cdot X_{2(R)} \quad (7)$$

$$\frac{dX_{2(R)}}{dt} = k_{21(R)} \cdot X_{1(R)} - k_{21(R)} \cdot X_{2(R)} \quad (8)$$

$$V_{1(S)} \cdot \frac{dC_{1(S)}}{dt} = k_{RS} \cdot X_{1(R)} - (k_{10(S)} + k_{21(S)}) \cdot V_{1(S)} \cdot C_{1(S)} + k_{21(S)} \cdot X_{2(S)} \quad (9)$$

$$\frac{dX_{2(S)}}{dt} = k_{12(S)} \cdot X_{1(S)} - k_{21(S)} \cdot X_{2(S)} \quad (10)$$

ここで, $C_{1(R)}$ は, 血液コンパートメントにおける **R-IBU** 全(結合同型+非結合同型)血漿中濃度である。 $X_{1(R)}$ および $X_{2(R)}$ は, それぞれ血液および組織コンパートメントにおける **R-IBU** の薬物量である。 $V_{1(R)}$ は, 血液コンパートメントの分布容積を示す。 $k_{10(R)} = k_{0(R)} + k_{RS}$, $k_{0(R)}$, k_{RS} , $k_{12(R)}$ および $k_{21(R)}$ は 1 次速度定数であり, 特に k_{RS} はキラル変換速度定数を表す。 **S-IB** 静脈内投与後の **S-IBU** 血漿中濃度経時変化におけるコンパートメントモデル解析で得られた $V_{1(S)}$, $k_{10(S)}$, $k_{12(S)}$ および $k_{21(S)}$ を **R-IBU** 静脈内投与後の **S-IBU** 血漿中濃度経時変化の解析に使用した。したがって, $V_{1(R)}$, $k_{10(R)}$, $k_{0(R)}$, k_{RS} , $k_{12(R)}$ および $k_{21(R)}$ の 6 つのパラメーターをあてはめにより算出した。

Rac-IBU 静脈内投与後の **R-IBU** および **S-IBU** 血漿中濃度経時変化は, それぞれ (7)~(10) および (9), (10) の式を数値積分して同時あてはめを行った。

CL_{tot} , キラル変換クリアランス (CL_{RS}), 代謝クリアランス (CL_{MET})は, 以下の式で算出した。

$$CL_{tot} = V_1 \cdot K_{10} \quad (11)$$

$$CL_{RS} = V_1 \cdot K_{RS} \quad (12)$$

$$R\text{-IBU}; CL_{MET} = CL_{tot} - CL_{RS}, \quad S\text{-IBU}; CL_{MET} = CL_{tot} \quad (13)$$

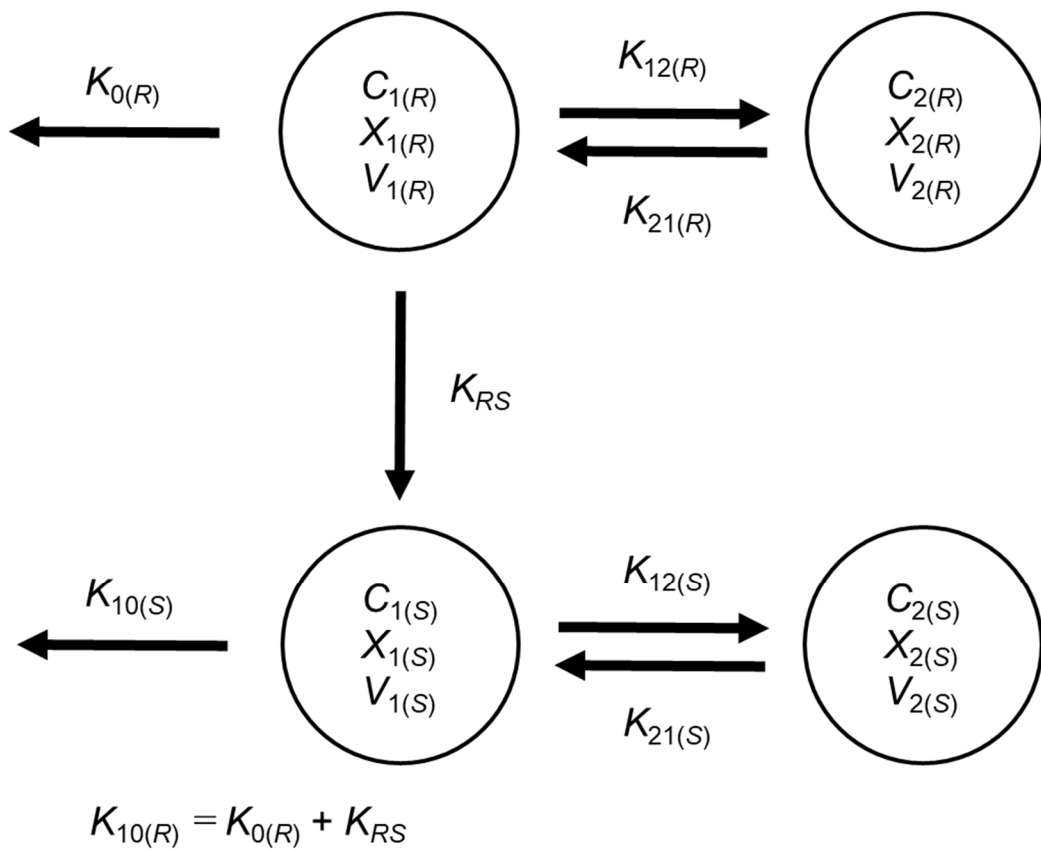


Fig. 4. A pharmacokinetic model with unidirectional inversion from *R*-IBU to *S*-IBU

キラル変換率 (F_i)は, 3)の実験から得られたデータを用い血漿濃度時間曲線下面積 (AUC)比較法, Deconvolution 法およびコンパートメントモデル解析による3つの方法で算出した。AUC 比較法による F_{iAUC} は, 次の式により計算した。

$$F_{iAUC} = \frac{AUC_{R \rightarrow S} \cdot Dose_S}{AUC_{S \rightarrow S} \cdot Dose_R} \quad (14)$$

ここで, $Dose_R$ および $Dose_S$ は, それぞれ R -IBU および S -IBU の投与量である。 $AUC_{R \rightarrow S}$ は, R -IBU 投与後の S -IBU の AUC を表し, $AUC_{S \rightarrow S}$ は S -IBU 投与後の S -IBU の AUC を表している。

Deconvolution 法を用いた F_{iDECON} は Mclachlan と Williams らおよび Karol と Goodrich らにより提唱された理論により算出した [72, 73]。つまり, Deconvolution 法は, 入力関数と出力関数から重み関数を求める方法で S -IBU 投与後の S -IBU, R -IBU 投与後の S -IBU をそれぞれ入力関数と出力関数とし, 次の式により求めた。

$$C_{R \rightarrow S}(t) = \int_0^{\infty} F_{iDECON}(\tau) \cdot C_{S \rightarrow S}(t - \tau) \quad (15)$$

ここで, $C_{R \rightarrow S}$ は R -IBU 静脈内投与後の S -IBU 血漿中濃度経時変化を表し, $C_{S \rightarrow S}$ は S -IBU 静脈内投与後の S -IBU 血漿中濃度経時変化を表す。 $F_{iDECON}(\tau)$ は R -IBU から S -IBU への経時的なキラル変換率として得られる。

コンパートメントモデル解析を用いた F_{iCOMP} および $T_{1/2inv}$ は, 次の式により算出した。

$$F_{iCOMP} = \frac{k_{RS}}{k_{0(R)} + k_{RS}} \quad (16)$$

$$T_{1/2inv} = \frac{\ln 2}{k_{RS}} \quad (17)$$

12)統計解析

実験結果はすべて各群の平均値 ± 標準偏差 (S.D.)で示した。コントロールラット群と AA ラット群の差の検定には対応のない t -検定を用い、 $p < 0.05$ を統計的有意差ありとした。 t -検定の計算には StatView for Windows (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA)を使用した。

第3節 実験結果

1) アジュバンド投与後の浮腫率

アジュバンド誘発性関節炎を確認するために後肢足蹠の浮腫率を19日間測定した。アジュバンド投与後11日目頃よりアジュバンド非投与の左足蹠で浮腫が見られ、慢性炎症(2次炎症)の発症が確認された(Fig. 5)。本研究では21日目のラットを慢性関節炎発症モデルとした。

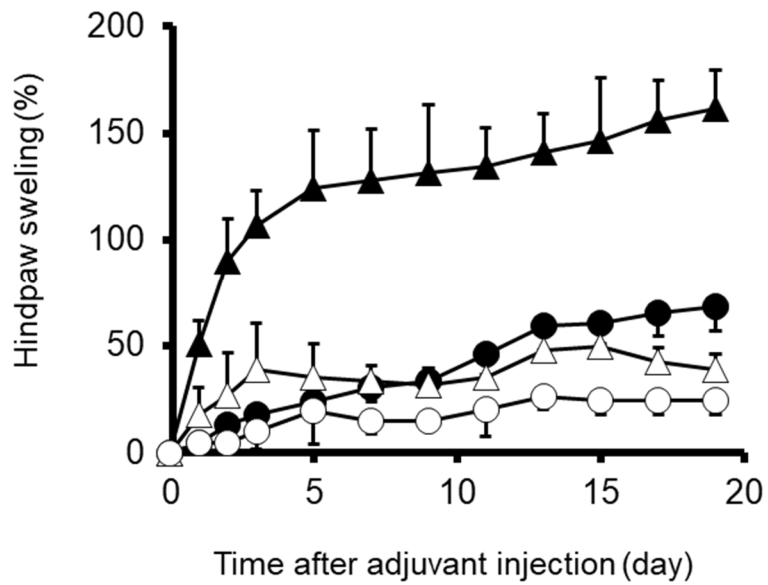


Fig. 5. Change in paw edema in control and AA rats

Female Sprague-Dawley rats received 0.05 mL suspension of *Mycobacterium butyricum* (10 mg/mL) into tail and right hind paw. ○, left; △, right in control rat; ●, left; ▲, right in AA rat. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=4).

2) 血漿中 ibuprofen の立体選択的体内動態に対するアジュバンド関節炎の影響

血漿中 IBU の体内動態に対する AA の影響を検討するために、コントロールおよび AA ラットに *rac*-IBU 20 mg/kg を静脈内投与後の血漿中 IBU エナンチオマー濃度を経時的に測定した。コントロールおよび AA ラット両群において IBU は立体選択的な体内動態を示した (Fig. 6)。いずれの群においても血漿中 *R*-IBU は *S*-IBU に比べ速やかに消失した。Fig. 6 の結果から算出したノンコンパートメント解析による IBU の薬物動態パラメーターを Table 2 に示した。コントロールおよび AA ラットのいずれの群においても、*R*-IBU の全身クリアランス (CL_{tot}) は、*S*-IBU に比べて著しく大きく、平均体内滞留時間 (MRT) は短かった。一方、定常状態分布容積 (V_{dss}) は、*R*-IBU で上昇する傾向が見られたが、両エナンチオマー間で有意差は認められなかった。AA ラット群の CL_{tot} は、コントロールラット群と比較して *R*-IBU で約 1.5 倍有意に上昇し、*S*-IBU は約 1.5 倍上昇する傾向が見られた。

次に、*R*-IBU のキラル変換に対する AA の影響を明らかにするために、*rac*-IBU 投与後の血漿中 IBU エナンチオマー濃度推移を Fig. 4 に示したコンパートメントモデルにより解析した。モデルから算出された IBU の薬物動態パラメーターを Table 3 に示した。Fig. 6 に実線で示したようにモデルによるあてはめは *rac*-IBU 静脈内投与後の血漿中濃度推移の実測値とよく一致した。AA ラット群で、血液コンパートメントの分布容積 (V_1) および組織コンパートメントの分布容積 (V_2) は、コントロールラット群と比較して若干高くなる傾向が認められた。代謝クリアランス (CL_{MET}) は、コントロールおよび AA ラットのいずれの群においても、両エナンチオ

マー間で有意差は認められなかった。しかし、*R*-IBU の CL_{tot} は *S*-IBU より有意に大きかった。これは、*R*-IBU の CL_{tot} は、*R*-体から *S*-体へのキラリ変換過程を含むため *S*-IBU の CL_{tot} に比べて著しく大きかった ($p < 0.05$)。AA ラット群で、*R*-IBU の CL_{tot} 、キラリ変換クリアランス (CL_{RS}) および CL_{MET} はコントロールラット群に比較して約 1.5 倍有意に上昇した。一方、*S*-IBU の CL_{tot} および CL_{MET} は、コントロールおよび AA ラット群の間に有意差はなかった。 $k_{0(R)}$ 、 k_{12} 、 k_{21} 、 k_{10} およびキラリ変換に対する速度定数 (k_{RS}) は、コントロールおよび AA ラット群の間に有意差はなかった。コントロールラット群の k_{RS} は 0.044 min^{-1} 、AA ラット群で 0.052 min^{-1} であり、*R*-IBU の消失速度定数 k_{10} との割合から *R*-IBU の約 70 % が *S*-IBU に変換する (キラリ変換) と推定された。

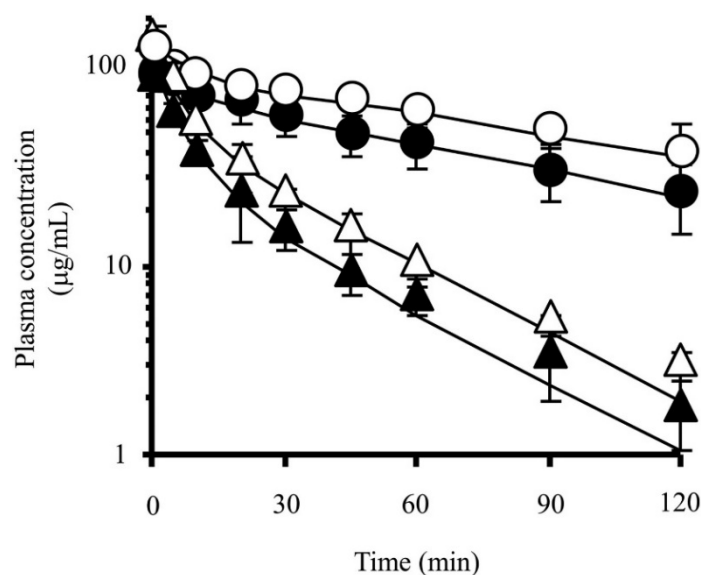


Fig. 6. Plasma concentration-time profiles of IBU enantiomers after intravenous administration of *rac*-IBU (20 mg/kg) in control and AA rats

△, *R*-IBU; ○, *S*-IBU in control rat; ▲, *R*-IBU; ●, *S*-IBU in AA rat. Solid lines represent the fitting curves using the pharmacokinetic model shown in Fig. 4. Results are expressed as the mean ± S.D. (n=3).

Table 2. Noncompartmental pharmacokinetic parameters of each enantiomer after intravenous administration of *rac*-IBU

Parameter	Control		AA	
	<i>R</i> -IBU	<i>S</i> -IBU	<i>R</i> -IBU	<i>S</i> -IBU
$T_{1/2}$ (min)	35.7 ± 6.8	89.5 ± 37.1	30.7 ± 6.5	69.0 ± 17.0 ^b
CL_{tot} (mL/min/kg)	3.70 ± 0.14	0.80 ± 0.27 ^b	5.40 ± 0.71 ^a	1.20 ± 0.31 ^b
MRT (min)	32.7 ± 3.9	127 ± 51.9 ^b	30.3 ± 5.7	97.5 ± 29.5 ^b
Vd_{ss} (mL/kg)	120 ± 18	89 ± 10	165 ± 38	115 ± 21
$AUC_{0-\infty}$ (µg · min/mL)	2720 ± 103	14031 ± 4496 ^b	1862 ± 230 ^a	8597 ± 2350 ^b

Results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3).

^a $p < 0.05$ compared with controls.

^b $p < 0.05$ compared with antipode.

Table 3. Compartmental pharmacokinetic parameters of each enantiomer after intravenous administration of *rac*-IBU

Parameter	Control		AA	
	<i>R</i> -IBU	<i>S</i> -IBU	<i>R</i> -IBU	<i>S</i> -IBU
V_1 (mL/kg)	63.1 ± 4.4	67.3 ± 9.9	86.0 ± 34.2	95.8 ± 18.3
V_2 (mL/kg)	56.4 ± 24.6	56.0 ± 23.2	80.3 ± 28.4	68.3 ± 29.9
CL_{tot} (mL/min/kg)	4.01 ± 0.40	1.46 ± 0.40 ^b	6.16 ± 1.11 ^a	2.19 ± 0.67 ^b
CL_{RS} (mL/min/kg)	2.75 ± 0.39	-	3.96 ± 0.67 ^a	-
CL_{MET} (mL/min/kg)	1.26 ± 0.09	1.46 ± 0.40	2.19 ± 0.55 ^a	2.19 ± 0.67
$k_{0(R)}$ (min ⁻¹)	0.020 ± 0.001	-	0.024 ± 0.007	-
k_{12} (min ⁻¹)	0.072 ± 0.031	0.070 ± 0.035	0.059 ± 0.030	0.070 ± 0.035
k_{21} (min ⁻¹)	0.074 ± 0.024	0.062 ± 0.020	0.076 ± 0.019	0.083 ± 0.018
k_{10} (min ⁻¹)	0.064 ± 0.007	0.021 ± 0.003 ^b	0.076 ± 0.017	0.023 ± 0.004 ^b
k_{RS} (min ⁻¹)	0.044 ± 0.007	-	0.052 ± 0.022	-

Results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3).

^a $p < 0.05$ compared with controls.

^b $p < 0.05$ compared with antipode.

The em dashes indicate no value because of unidirectional chiral inversion of IBU.

3) Ibuprofen のキラル変換に対するアジュバンド関節炎の影響

IBU のキラル変換に対する AA の影響を詳細に調べるため、IBU の各エナンチオマーをそれぞれ 10 mg/kg 静脈内投与し、血漿中 IBU 濃度の経時変化をコントロールおよび AA ラット群で比較検討した (Fig. 7)。S-IBU 投与後の血漿中には R-IBU は検出されず、ラットでは S-IBU から R-IBU へのキラル変換は起こらないことが示された (Fig. 7A)。R-IBU 投与後に血漿中に S-IBU が観察され、生体内で R-IBU から S-IBU へのキラル変換が起こったことが示された (Fig. 7B)。R-IBU 投与後、S-IBU の血漿中濃度は約 20 min まで上昇した。その後、R-IBU および S-IBU ともに減少し、約 30 min 以降は S-IBU の血漿中濃度が R-IBU より高くなった。R-IBU 投与後のキラル変換率を算出するため、ノンコンパートメント解析およびコンパートメントモデルによる解析によりそれぞれ速度論的パラメーターを算出した (Tables 4 and 5)。各エナンチオマー投与後の R-IBU および S-IBU の $T_{1/2}$ および V_{dss} は、コントロールと AA ラット群間で有意な変化はみられなかった (Table 4)。AA ラット群で R-IBU および S-IBU の CL_{tot} は、コントロールラット群に比べて有意に上昇したことに伴い AUC が減少した。Table 5 より AA ラット群の *rac*-IBU 投与後の V_1 および V_2 が増加する傾向があることが示された。AA ラット群の R-IBU および S-IBU の CL_{tot} および CL_{MET} は、コントロールラット群に比べて有意に上昇し、その結果は *rac*-IBU 静脈内投与後と同様であった。R-IBU 投与後に R-IBU から S-IBU に変換する割合 (F_i) および変換半減期 ($T_{1/2inv}$) を AUC 解析, Deconvolution 法およびモデル解析を用いてコントロールおよび AA ラット群で推定した (Table 6)。R-IBU の F_i 値はコントロールおよび AA ラット群ともに約 50% であり、R-IBU の半数は S-IBU に

キラル変換し、コントロールと AA ラット群で F_i 値にほとんど差がないことが確認された。

つぎに、キラル変換に関わる酵素に対する AA の影響を明らかにするために、コントロールと AA ラットの肝ミクロソーム中におけるアシル CoA 合成酵素 (ACS)1 と 2-アシルプロピオニル CoA エピメラーゼ (APCE) のタンパク質量を測定した (Fig. 9)。ACS1 と APCE は、IBU のキラル変換に関与している。ACS1 のタンパク量は、コントロールと AA ラット群の間で変化はなかった。APCE の発現は、AA ラット群で有意に減少していることが確認された。

以上の結果より、AA ラットでは全身クリアランス (CL_{tot}) の上昇にともない R-体から S-体へのキラル変換クリアランス (CL_{RS}) が上昇するが、キラル変換率 (F_i) そのものは影響を受けていないことが明らかとなった。また、AA ラットでは、キラル変換に関与する酵素 APCE の発現は有意に減少しているが、キラル変換率には影響を及ぼさないことが示唆された。

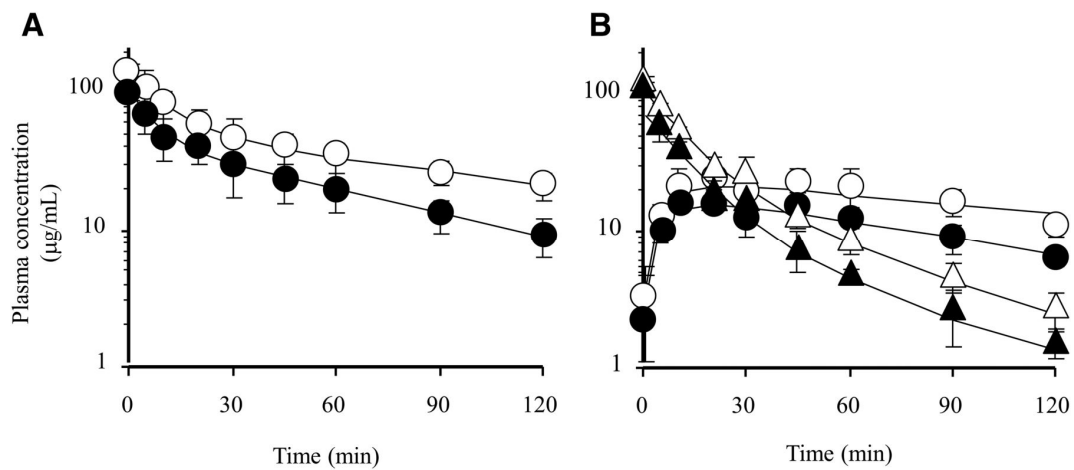


Fig. 7. Plasma concentration-time profiles of IBU enantiomers after intravenous administration of S-IBU (10 mg/kg) (A) or R-IBU (10 mg/kg) (B) in control and AA rats

△, R-IBU; ○, S-IBU in control rat; ▲, R-IBU; ●, S-IBU in AA rat. Solid lines represent the fitting curves using the pharmacokinetic model shown in Fig. 4. Results are expressed as the mean ± S.D. (n=3).

Table 4. Noncompartmental pharmacokinetic parameters of each enantiomer after intravenous administration of R-IBU or S-IBU

Parameter	Control			AA		
	R-IBU after R-IBU	S-IBU after R-IBU	S-IBU after S-IBU	R-IBU after R-IBU	S-IBU after R-IBU	S-IBU after S-IBU
$T_{1/2}$ (min)	33.9 ± 4.5	77.8 ± 24.4	84.2 ± 23.7 ^b	30.4 ± 5.0	69.8 ± 23.9	56.3 ± 4.8 ^b
CL_{tot} (mL/min/kg)	4.20 ± 0.23	-	1.30 ± 0.18 ^b	6.20 ± 0.66 ^a	-	2.40 ± 0.40 ^{a, b}
MRT (min)	32.8 ± 5.4	-	109.3 ± 30.5 ^b	26.7 ± 3.1	-	69.6 ± 8.77 ^{a, b}
Vd_{ss} (mL/kg)	137 ± 18	-	146 ± 54	164 ± 10	-	168 ± 23
AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL}$)	2386 ± 129	3549 ± 474	7682 ± 1054 ^b	1624 ± 171 ^a	2090 ± 265 ^a	4129 ± 568 ^{a, b}

Results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3).

^a $p < 0.05$ compared with controls.

^b $p < 0.05$ compared with antipode.

The em dashes indicate no value because of unidirectional chiral inversion of IBU.

Table 5. Compartmental pharmacokinetic parameters of each enantiomer after intravenous administration of *R*-IBU or *S*-IBU

Parameter	Control		AA	
	<i>R</i> -IBU	<i>S</i> -IBU	<i>R</i> -IBU	<i>S</i> -IBU
V_1 (mL/kg)	90.1 ± 20.0	67.2 ± 9.8	113 ± 38	99.3 ± 18.3
V_2 (mL/kg)	78.5 ± 29.2	93.4 ± 72.2	125 ± 52	112 ± 69
CL_{tot} (mL/min/kg)	4.28 ± 0.19	1.26 ± 0.12 ^b	6.87 ± 1.05 ^a	2.83 ± 0.92 ^{a, b}
CL_{RS} (mL/min/kg)	2.21 ± 0.53	-	3.81 ± 0.42 ^a	-
CL_{MET} (mL/min/kg)	2.07 ± 0.32	1.26 ± 0.12 ^b	3.05 ± 0.42 ^a	2.83 ± 0.92 ^a
$k_{0(R)}$ (min ⁻¹)	0.023 ± 0.003	-	0.029 ± 0.009	-
k_{12} (min ⁻¹)	0.026 ± 0.018	0.056 ± 0.030	0.029 ± 0.010	0.058 ± 0.020
k_{21} (min ⁻¹)	0.031 ± 0.018	0.046 ± 0.020	0.033 ± 0.013	0.050 ± 0.017
k_{10} (min ⁻¹)	0.048 ± 0.008	0.019 ± 0.004 ^b	0.060 ± 0.008	0.028 ± 0.006 ^b
k_{RS} (min ⁻¹)	0.026 ± 0.011	-	0.032 ± 0.003	-

Results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3).

^a $p < 0.05$ compared with controls.

^b $p < 0.05$ compared with antipode.

The em dashes indicate no value because of unidirectional chiral inversion of IBU.

Table 6. F_i and $T_{1/2inv}$ of inversion calculated by AUC analysis, deconvolution method, and model analysis in control and AA rats

	Control			AA		
	AUC analysis (F_{iAUC}) ^a	Deconvolution method (F_{iDECON}) ^b	Model analysis (F_{iCOMP}) ^c	AUC analysis (F_{iAUC}) ^a	Deconvolution method (F_{iDECON}) ^b	Model analysis (F_{iCOMP}) ^c
F_i	0.47 ± 0.07	0.51 ± 0.13	0.52 ± 0.12	0.51 ± 0.08	0.53 ± 0.18	0.56 ± 0.05
$T_{1/2inv}$ (min)	-	15.9 ± 4.4	29.7 ± 10.5	-	14.1 ± 3.4	25.8 ± 7.7

Results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3).

^a $F_{iAUC} = AUC_{R-S}/AUC_{S-S}$

^b Calculated using the deconvolution method.

^c $F_{iCOMP} = k_{RS}/k_{0(R)} + k_{RS}$

The em dashes indicate no value because of unidirectional chiral inversion of IBU.

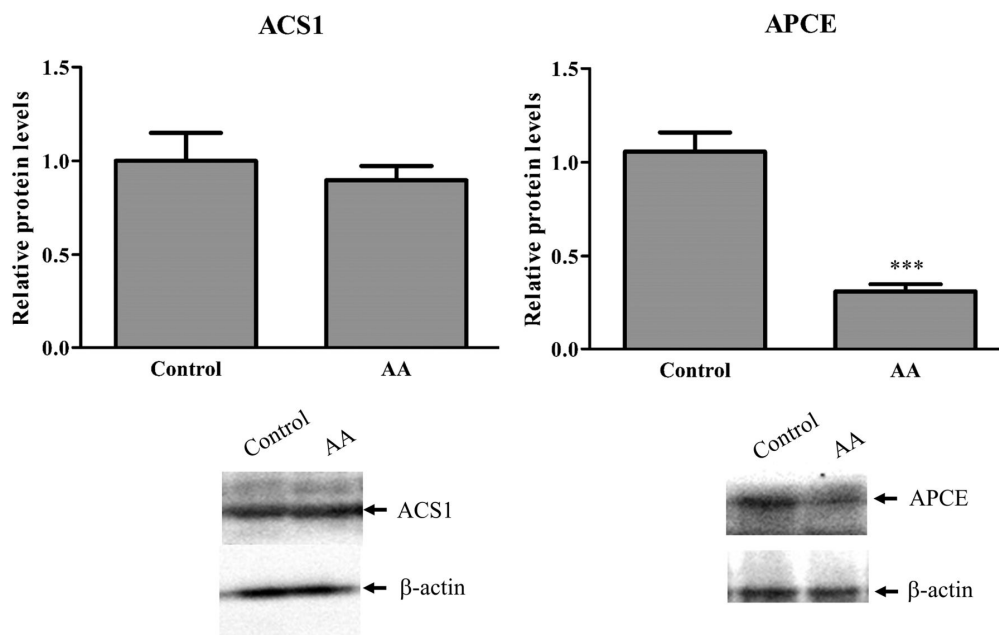


Fig. 9. Relative protein levels of ACS1 and APCE in hepatic microsomes of control and AA rats

Results are expressed as the mean \pm S.D. (n = 5 or 6). Significant differences between control and AA rats are indicated. *** $p < 0.001$.

4) グルクロン酸抱合活性および CYP450 含量へのアジュバンド関節炎の影響

代謝酵素活性に対する AA の影響を評価するために、肝ミクロソームの IBU に対するグルクロン酸抱合代謝活性および CYP450 含量をコントロールおよび AA ラットで測定した (Table 7)。グルクロン酸抱合活性は立体選択性がみられ、コントロールおよび AA ラット群で *S*-IBU の方が *R*-IBU より約 3~4 倍高い活性を示した。AA ラット群では、いずれのエナンチオマーに対しても活性はコントロールラット群の約 1/2 に減少した ($p < 0.05$)。酸化反応に関与する CYP450 含量においても AA ラット群でコントロールラット群の約 70% に減少した。

したがって、AA 誘導により、*R*-IBU および *S*-IBU とともにグルクロン酸抱合活性および P450 含量が有意に減少したことから、AA ラットでは IBU の第 I 相および第 II 相反応による代謝が低下していることが示唆された。

Table 7. Glucuronidation activities for *R*-IBU and *S*-IBU and P450 contents in control and AA rats

		Control	AA
Glucuronidation activity (nmol/min/mg protein)	<i>R</i> -IBU	0.23 ± 0.03	0.10 ± 0.01 ^a
	<i>S</i> -IBU	0.71 ± 0.07 ^b	0.40 ± 0.04 ^{a, b}
P450 contents (nmol/protein)		0.69 ± 0.10	0.48 ± 0.05 ^a

Results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3).

^a*p* < 0.05 compared with controls.

^b*p* < 0.05 compared with antipode.

5) Ibuprofen タンパク結合に対するアジュバンド関節炎の影響

タンパク結合率に対する AA の影響を評価するために、コントロールおよび AA ラットの R-IBU および S-IBU の血漿タンパク質結合量を測定した (Table 8)。IBU の両エナンチオマーの *in vitro* および *in vivo* 血漿中非結合型分率 (f_u)は、AA ラット群はコントロールラット群に比べて約 2.5 倍上昇した。IBU の f_u は立体選択的であり、S-体に比較して R-体の方がタンパク結合が強かった。このことから、AA ラットにおいては、IBU のタンパク結合が低下していることが明らかとなった。

つぎに、AA ラットにおいて IBU のタンパク結合率が有意に減少したことから、IBU のタンパク結合に大きく関与する血漿中アルブミン濃度をコントロールおよび AA ラット群において測定した (Table 9)。血漿中アルブミン濃度は AA ラット群で有意に低い値を示した。また、総タンパク濃度についてもコントロールラット群よりも AA ラット群で有意に低い値を示した。

以上の結果から、AA ラットにおける IBU の非結合型濃度の増加はアルブミン濃度が有意に低下したことによりタンパク結合が減少したことが原因と考えられた。

Table 8. *In vitro* and *in vivo* plasma unbound fractions (f_u) (%) of IBU in control and AA rats

		Control		AA	
		f_{uR} -IBU	f_{uS} -IBU	f_{uR} -IBU	f_{uS} -IBU
<i>In vitro</i>		0.72 ± 0.24	1.38 ± 0.34	2.51 ± 0.56 ^{b,c}	3.40 ± 0.57 ^{b,c}
<i>In vivo</i>	Post dosing (min)				
	10	2.21 ± 0.32	2.96 ± 0.60	5.64 ± 0.66 ^{b,c}	8.38 ± 3.18 ^{b,c}
	30	2.16 ± 0.29	3.59 ± 0.53	5.81 ± 0.77 ^{b,c}	7.42 ± 1.17 ^{b,c}
	Average ^a	2.19	3.27	5.73	7.90

Results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3).

In vitro, *rac*-IBU (at a total concentration of 50 µg/ml); *in vivo*, dose, *rac*-IBU 20 mg/kg.

^a Average values between 10 and 30.

^b $p < 0.05$ compared with controls.

^c $p < 0.05$ compared with antipode.

The em dashes indicate no value because of unidirectional chiral inversion of IBU.

Table 9. Plasma levels of total protein and albumin in control and AA rats

	Control	AA
Total protein (g/dL)	6.9 ± 0.1	5.8 ± 0.1 ^a
Albumin (g/dL)	2.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1 ^a

Results are expressed as the mean ± S.D. (n = 3).

^a*p* < 0.05 compared with controls.

第4節 考察および小括

炎症時には薬物代謝酵素活性や血漿中タンパク質量が低下する [64, 66]。リウマチ性関節炎の動物モデルとして広く用いられる AA ラットにおいても、薬物代謝酵素活性や、タンパク結合が変化することで薬物の体内動態が変化することが報告されている [59-62, 66, 74]。たとえば, AA ラットで KET の非結合型血漿クリアランスは有意に減少するが, CL_{tot} は変化しないという報告がある [66]。一方, flurbiprofen では AA ラットで CL_{tot} が約2倍に上昇することが報告されている [74]。そこで本章では AA ラットを用いて IBU の立体選択的体内動態ならびに、特に薬効および毒性発現に関与するキラル変換に対する慢性炎症の影響を検討した。

AA ラットでは、肝ミクロソーム中の IBU のグルクロン酸抱合化活性および P450 含量は、それぞれ約 50% および 70% に減少したが (Table 7), IBU の CL_{tot} は有意に上昇した。IBU の f_u レベルの上昇は, AA ラットの血漿アルブミン量の低下したことに起因すると考えられた (Tables 8 and 9)。Iwaki らのグループでは, AA ラットの血漿タンパク質量の変化により薬物のタンパク質結合が変化し、炎症状態下で血漿タンパク質と結合率の高い propranolol と flurbiprofen の薬物動態に影響を与えることを示している [75]。ヒトにおいても, IBU は治療濃度においてアルブミンとの結合率が 98% 以上と高い [76]。S-IBU の f_u は R-IBU と比較して 2 倍高く (Table 8), これまでに報告されている結果と同様であった [77, 78]。S-IBU は薬理作用の発現に関与していることから, S-IBU の血漿中濃度に対する AA の影響を明らかにすることは重要である。AA ラットでは、コントロールラットと比較してキラル変換率 (F_i) およびキラル変換の半減期 ($T_{1/2inv}$) は変化しなかったが (Table 6),

rac-IBU, *R*-IBU および *S*-IBU を静脈内投与後の *S*-IBU の血漿中濃度の低下が認められたことから (Figs. 6 and 7), AA ラットでは IBU の薬理作用が低下し, 薬効や毒性発現が変化する可能性がある。

IBU などの NSAIDs は, 肝臓で AG に代謝され胆汁中に排泄される [79]。AA ラットでは, *R*-IBU および *S*-IBU のグルクロン酸抱合化活性は, コントロールラットに比べそれぞれ 57% および 44% 減少した (Table 7)。これらの結果は, Meunier らによる KET に関する報告と一致した [66]。AA ラットの肝ミクロソーム中の P450 含量は, コントロールラットに比べて約 70% と有意に減少した。IBU を含むほとんどの 2-APA は肝抽出量が低い代謝律速型薬物であるため, これらの薬物の CL_{tot} は f_u と代謝固有クリアランス (CL_{int}) の両方に依存する ($CL_{tot} = f_u \cdot CL_{int}$)。IBU は主に P450 と UGT で代謝される [80, 81]。 CL_{int} は酸化や抱合反応により代謝された薬物を体外へ除去する能力を反映するため, AA ラットの CL_{int} はコントロールラットのおおよそ半分低下していると考えられる。したがって, *rac*-IBU 投与後の AA ラットの IBU の CL_{tot} の約 1.5 倍の上昇は, コントロールラットに比べて *in vivo* での IBU の血漿中の f_u が約 2.5 倍上昇し (Table 8), CL_{int} が約半分に減少した結果と考えられる。KET では, AA ラットの CL_{tot} が有意に変化しない [66]。この結果は, KET のタンパク結合が IBU に比較して小さく, f_u は 2 倍程度の増加しか示さず, CL_{int} の低下と相殺されたため, みかけ上の CL_{tot} に変化が認められないものと思われる。AA ラットの flurbiprofen の CL_{tot} が著しく上昇したのは, NSAIDs のタンパク結合率が比較的高いために誘発されたものと推測される [74, 82]。 *R*-IBU または *S*-IBU 静脈内投与後, *S*-IBU の CL_{tot} , CL_{RS} , CL_{MET} に対する AA の影響は *R*-IBU と比較して大きかったが (Fig 10, Table 5), *rac*-IBU 静脈内投与後, *R*-IBU および *S*-IBU の

CL_{tot} , CL_{MET} に対する AA の影響はほぼ同じであった (Table 3)。このように, *rac*-IBU 静脈内投与後の IBU の各エナンチオマーの薬物動態は, *R*-IBU または *S*-IBU 静脈内投与後の薬物動態とは若干異なることが示された。Itoh らは, 血漿タンパク結合におけるエナンチオマー間の相互作用が IBU の立体選択的な薬物動態に影響を及ぼすことを報告している [83]。したがって, *rac*-IBU の静脈内投与では, 各エナンチオマーの薬物動態に加え, *R*-IBU と *S*-IBU の相互作用を考慮する必要がある。

Rac-IBU 静脈内投与後の *S*-IBU の血漿中濃度は *R*-IBU と比較して有意に高かった (Fig. 6)。同様の立体選択的な薬物動態は KET や fenoprofen でも認められている [54, 84]。Fig. 6 の結果から算出した *R*-IBU と *S*-IBU の CL_{MET} は, コントロールラットと AA ラットで同様の値であったが, *S*-IBU に比較して *R*-IBU の CL_{tot} が大きかった (Table 3)。この原因のひとつには, *R*-IBU の CL_{tot} には酸化およびグルクロン酸抱合化以外にキラル変換過程を含むため *S*-IBU の CL_{tot} に比べて著しく高値を示すものと考えられる。*R*-IBU の CL_{tot} からキラル変換クリアランス (CL_{RS}) を差し引いて得られるクリアランスは代謝クリアランス (CL_{MET}) に相当すると考えられ, *S*-IBU の $CL_{tot} (\doteq CL_{MET,R})$ とほぼ同様の値を示した。*S*-IBU または *R*-IBU の CL_{tot} は, 以下の式で表すことができる。

$$CL_{tot(S)} = CL_{MET(S)} = fu_{(S)} \times CL_{int(S)} = fu_{(S)} \times (CL_{ox(S)} + CL_{glu(S)}) \quad (18)$$

$$CL_{tot(R)} = CL_{MET(R)} + CL_{RS} = fu_{(R)} \times CL_{int(R)} = fu_{(R)} \times (CL_{ox(R)} + CL_{glu(R)} + CL_{RS,int}) \quad (19)$$

ここで、 CL_{ox} 、 CL_{glu} は非結合型 IBU に対する水酸化による代謝クリアランスおよびグルクロン酸抱合による代謝クリアランスである。

式(19)より

$$CL_{MET(R)} = fu_{(R)} \times (CL_{ox(R)} + CL_{glu(R)}) \quad (20)$$

S-IBU の方が fu や CL_{glu} が高いにもかかわらず CL_{MET} が同程度の値を示したことから (Tables 7 and 8) , *R*-IBU と比較して *S*-IBU の水酸化活性が優位であった可能性がある。Hamman らおよび Chang らは、IBU エナンチオマーの CYP2C による立体選択的な代謝の程度がほぼ同じであることを示している [80, 85]。*In vivo* では、*R*-IBU から *S*-IBU への一方向のキラル反転が起こるため、*R*-IBU (~30%) に比べて *S*-IBU (~70%) では P450 によるクリアランスがより重要である [76, 86]。*S*-IBU のグルクロン酸化活性は *R*-IBU の 3~4 倍高かったが (Table 7), *S*-IBU が優位にグルクロン酸抱合化される詳細なメカニズムは不明であるが、この結果は、*S*-IBU が *R*-IBU に比べて AG に変換されやすい el Mouelhi らの報告と一致する [87]。

コントロールおよび AA ラットともに、*S*-IBU を静脈内投与すると *R*-IBU は血漿中に検出されなかったが (Fig. 7A), *R*-IBU を静脈内投与すると *S*-IBU が血漿中に観察された (Fig. 7B)。今回の結果から、ラットでは IBU は *R*-IBU から *S*-IBU へ一方向にキラル変換していることが確認できた。これらの結果は、Knihinicki ら、Ito ら、および Chen らによるラットでの結果と一致した [44, 83, 88]。コントロールの IBU の F_i は約 50% であり、*R*-IBU の半分が *S*-IBU にキラル変換していることがわかった。この結果は、Knihinicki ら、Ito ら、および Lee らの研究結果と一致した [83, 88, 89]。

興味深いことに、コントロールと AA ラットの F_i と $T_{1/2inv}$ の値には、ほとんど差が認められなかった (Table 6)。Fig. 3 に示すようにキラル変換は以下の 3 つのステップからなる [42, 90]。1) 長鎖脂肪酸アシル CoA 合成酵素 (ACS) による *R*-IBU から *R*-IBU-CoA チオエステルへの活性化過程, 2) 2-アリールプロピオニル CoA エピメラーゼ (APCE) による *R*-IBU-CoA チオエステルのラセミ化過程, 3) 加水分解酵素による *S*-IBU に分解する過程である。APCE は主に肝臓と腎臓に存在する [37, 49]。炎症状態では、肝臓の代謝酵素の活性が低下した (Table 7)。この結果は、Toda らおよび Meunier らの報告と一致する [64, 65]。しかし、IBU の生体内におけるキラル変換率は、AA の影響を受けなかった。AA ラットの APCE のタンパク質量は、コントロールラットに比べて有意に減少したが、ACS1 のタンパク質量は減少しなかった (Fig. 9)。これらの結果は、AA ラットのタンパク結合率 (非結合型分率) が変わらない場合、*R*-IBU から *S*-IBU へのキラル変換におけるエピマー化率は低下するが、CoA チオエステルの生成は低下しないことを示唆するものであった。しかし、IBU のキラル変換の律速段階は CoA チオエステル形成であり、エピマー化ではないため、AA ラットの APCE のタンパク質量の減少は IBU のキラル変換率にほとんど影響しない [42, 91-93]。 CL_{tot} , CL_{RS} , CL_{MET} は IBU の代謝活性とタンパク結合能の両方に依存する。今回、AA ラットの血漿中 IBU の f_u は、コントロールラットの 2~3 倍であった (Table 8)。また、AA ラットのグルクロン酸抱合活性および P450 含量は有意に低下した (Table 7)。AA ラットの CL とキラル変換率の変化が一致しない原因として、AA ラットの P450, UGT およびキラル変換を触媒する酵素の活性低下が、IBU の血漿中非結合型分率の上昇により相殺された可能性がある。その結果、キラル変換率はコントロールと AA ラットの間で変化がなかった。AA ラットでは、IBU に

対するタンパク結合の変化が IBU 薬物動態に及ぼす影響は, APCE 活性の変化よりも大きい可能性がある。その結果, キラル変換率はコントロールと AA ラットの間で変化しなかった可能性がある。AA ラットは, 関節リウマチのヒトで観察されるのと同様の骨と軟骨の変化を伴う全身性の炎症性疾患を示す [94]。関節炎患者の炎症が立体選択的な薬物動態に及ぼす影響は非常に興味深い。しかしながら, ヒトの関節炎が IBU のような 2-APA の NSIADs の立体選択的薬物動態に影響を与えるかどうかは不明である。関節炎患者におけるキラル変換の変化について, さらなる研究を行う必要がある。

第 1 章の結論として, 慢性炎症モデルラットである AA ラットにおいて薬理不活性な *R*-IBU から薬理作用を有する *S*-IBU へのキラル変換率に対する AA の影響は, ほとんどないことが確認された。AA ラットにおいて IBU の代謝に関係する肝薬物代謝酵素活性が明らかに減少しているにもかかわらず, タンパク結合の減少による IBU の f_u の大きな上昇により CL_{tot} の上昇が確認された。これらの結果, 慢性炎症時に, P450 および UGT の活性低下と f_u の上昇を介した IBU の立体選択的薬物動態のこれらの変化は, 薬効や毒性発現に影響を及ぼす可能性がある。

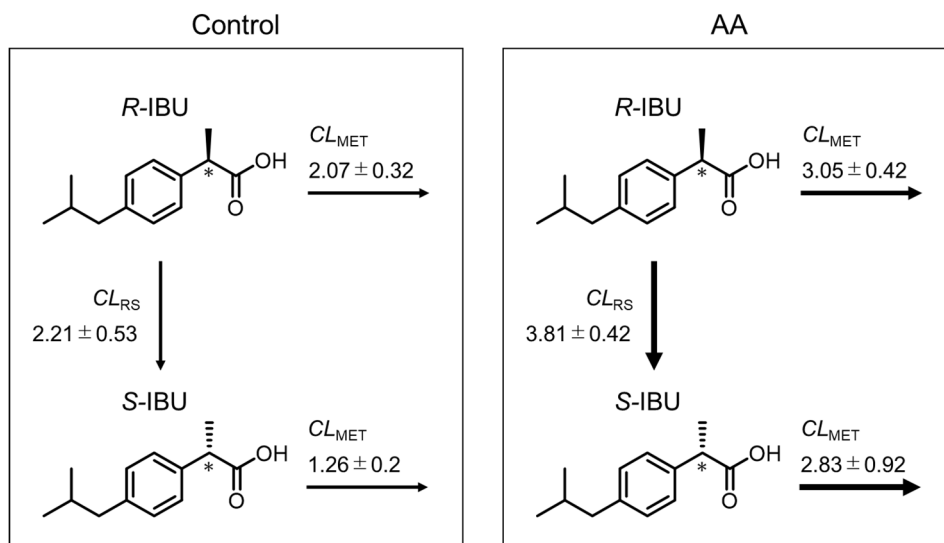


Fig. 10. Effects of AA induction on CL_{RS} (ml/min/kg) and CL_{MET} (ml/min/kg) of IBU
Chiral centers indicated by an asterisk.

第2章 ラット肝ミクロソームにおける NSAID-アシルグルクロン酸抱合体の生成・分解特性と特異体質性毒性リスクとの関連性

第1節 緒言

非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) などのカルボキシ基を有する薬物は、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT)により、アシルグルクロン酸抱合体 (AG)へ代謝され、基本的には尿中や胆汁中に排出される。しかし、AGの一部は生体内のタンパク質と共有結合することにより、結合したタンパク質の機能阻害や、免疫応答の誘導により薬物誘発性肝障害 (DILI)を含む特異体質性毒性 (IDT)を惹起すると考えられている [95,96]。Iwaki らのグループは、サンドイッチ培養したラット肝細胞において、NSAIDsの一つである diclofenac (DIC)の AG が細胞内に蓄積することより、細胞内のタンパク質との共有結合体の増大および細胞毒性が誘発されることを示した [24]。したがって AG は薬物による IDT 発症に重要な反応性代謝物の一つである。

AG に関連する IDT のリスクを予測するには、AG の緩衝液中での半減期やタンパク質との共有結合の程度を調べることによって、AG の化学的不安定性を評価することが有用である [21, 97-99]。Sawamura らは、リン酸緩衝液 (pH7.4, 37°C) 中における AG の半減期を評価することにより、IDT リスクが添付文書で警告されていない市販薬と IDT リスクが警告されている市販薬および市場撤退した薬を判別できることを示した [19]。しかし、AG の化学的不安定性のみでは薬物による毒性が特異体質性に惹起されることが説明できない。実際に、Iwaki らのグループでは AG 生成量は薬物によって異なり、生成される AG 量は、NSAIDs の

タンパク質への共有結合の程度を決定する重要な要因であると明らかにしている [23]。さらに、ほとんどの AG は、アルブミン、 β -glucuronidase および esterase などによって酵素的に加水分解される [100, 101]。Smith らは、重篤な副作用のため販売中止となった NSAID である ZOM-AG と esterase 阻害薬の phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を併用すると ZOM-AG の血漿中濃度が増加することを示した [102]。ZOM は、esterase 阻害薬である tri-*o*-tolyl phosphate, グルタチオン合成阻害薬である L-buthionine-(*S*, *R*)-sulfoximine との併用により、血漿および腎臓の ZOM-AG 濃度を上昇させることで急性腎障害が惹起されることも報告されている [27]。したがって、AG に関連する IDT リスクを検討する際には、AG の化学的不安定性に加えて、AG の生成と酵素による加水分解の程度を考慮する必要がある。

そこで、第 2 章では、IDT リスクの異なる種々の NSAIDs を用いて、ラット肝ミクロソーム中における AG の生成と消失を同時に評価することで、毒性予測の評価方法の確立を目的とした。AG は不安定なため化学合成が難しく、調製するには時間を要する。従来 of 緩衝液中での AG 消失評価法とは異なり、本方法では新薬候補の AG を調製する必要がないため、従来 of 方法と比較してより簡便に化学的不安定性を評価できる。さらに、 β -glucuronidase 阻害薬 D-saccharic acid 1,4-lactone (D-SL) および esterase 阻害薬 PMSF の AG 加水分解酵素阻害薬存在下 (Inh+) と、非存在下 (Inh-) で検討することにより、AG の化学的不安定性と加水分解酵素による分解および非酵素的な分解を区別して評価することを試みた。今回の検討では、NSAIDs を IDT リスクの観点から、毒性の強さにより市場撤退 (Withdrawn, WDN) 群、警告 (Warning, WA) 群、および安全 (Safe, SA) 群の 3 つの

カテゴリーに分類した (Table 10) [98, 103-109]。また, 化学構造に基づく NSAIDs の分類を Fig. 11 に示す。

Table 10. Drugs used in the present study

Compound	Category	DILI concern	DILI Class
Ibufenac	WDN ^{a,b}	Most ^b	–
Lumiracoxib	WDN ^b	Most ^{b,d}	Positive ^d
Tometin	WDN ^{a,b}	N/A ^b	–
Zomepirac	WDN ^{a,b}	N/A ^b	Positive ^e
Diclofenac	WA ^{a-c}	Most ^{b-d}	Positive ^{d-h}
Etodorac	WA ^b	–	Positive ^d
Mefenamic acid	WA ^a	Most ^{b,d}	Positive ^{g,h}
Ketoprofen	SA ^c	Less ^c	Negative ^f
Ibuprofen	SA ^b	Less ^b	–

DILI: drug-induced liver injury.

a Iwamura et al. (2015); b Oda et al. (2016); c Xu et al. (2018); d Oda et al. (2021);

e Nakayama et al. (2009); f Usui et al. (2009); g Mizoi et al. (2020);

h Khetani et al. (2013).

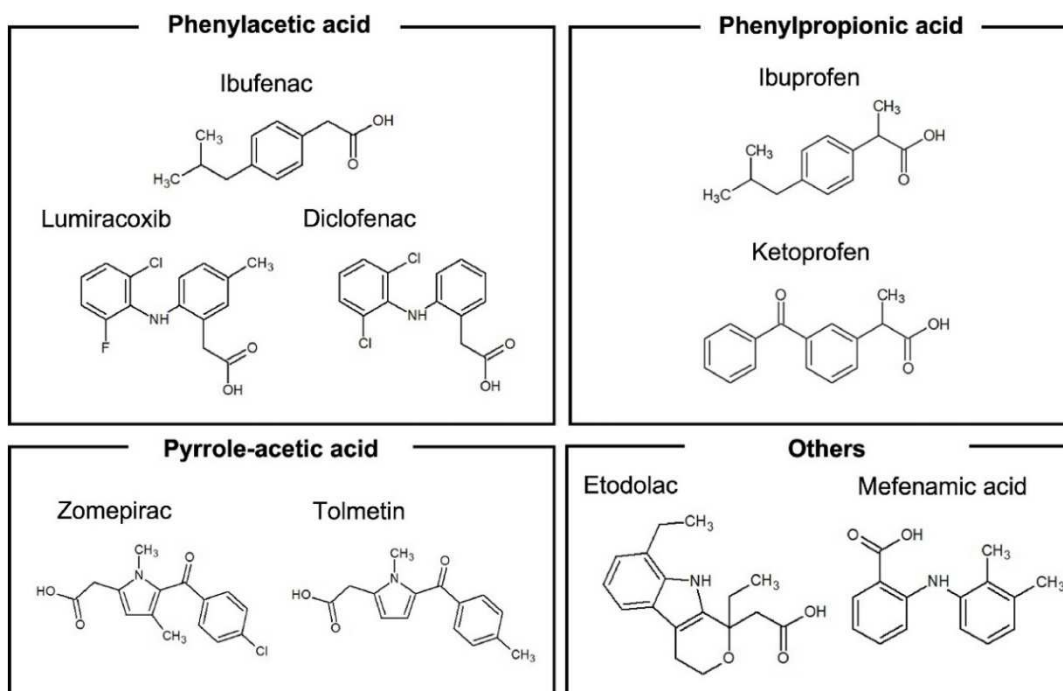


Fig. 11. Chemical structures of NSAIDs investigated in this study

NSAIDs are categorized according to their chemical structures as phenylacetic acid, pyrrole-acetic acid, phenylpropionic acid, and others.

第2節 実験材料および方法

1) 実験材料および動物

Diclofenac (DIC), zomepirac (ZOM), D-saccharic acid 1,4-lactone (D-SL) は Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA) から購入した。Lumiracoxib (LUM), *R/S*-ibuprofen (IBU), および etodolac (ETO)は, Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)から購入した。Tolmetin (TOL), ibufenac (IBF), *R/S*- ketprofen (KET), mefenamic acid (MEF), DIC-AG, ZOM-AG, *R/S*-IBU-AG, IBF-AG, *R/S*-KET-AG, および MEF-AG は Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada)より購入した。ETO-AG は, Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)から購入した。PMSF および UDP- glucuronic acid (UDPGA)はナカライテスク株式会社 (京都)より入手した。その他, 試薬はすべて試薬特級品または HPLC 用試薬を使用した。

動物実験は, 8~9 週齢の Wistar/ST 系ラット (雄性, 体重 240-290 g, 清水実験動物研究所, 京都)を使用した。ラットは, 清水実験動物研究所 (京都)から購入した。ラットは動物実験施設において, 室温 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$ の条件下, 12 hr の明暗サイクル (明期: 午前7時~午後7時) で1週間予備飼育し, 疾病の有無や健康状態を確認して実験に使用した。実験まで固形飼料 (MF, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) や水を自由摂取できる環境においた。動物の取り扱いおよび飼育は, 近畿大学により承認された「近畿大学動物実験規程」に従った。

2) ラット肝ミクロソームの調製法

ラット肝ミクロソームは常法に従い調製した。ラットを diethyl ether (ナカライテスク株式会社)の吸入麻酔下で開腹し、門脈に surflo I.V. catheter (テルモ株式会社, 東京)を挿入し、生理食塩水で肝臓を脱血した。脱血したラット肝を 1.15% KCl で洗浄し、ホモジナイズ後に遠心分離し (9,000×g, 4°C, 25 min), 未破碎の組織を除いた。上清を himac CP 80α (日立工機株式会社, 東京)を用いて 2 回遠心分離した (10,5000×g, 4°C, 60 min)。得られた沈殿を 1.15% KCl に懸濁させ、Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, MA, USA)を用いてタンパク定量後、ミクロソーム画分として実験に使用した。

3) ラット肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の生成と分解 実験

反応液 (100 mM Tris-HCl pH7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2% Triton X-100, 10 mg/ml ラット肝ミクロソーム)に 1 mM となるように各 NSAID を添加し、AG 加水分解酵素阻害薬阻害剤ありには esterase 阻害薬である 2 mM PMSF および β-glucuronidase 阻害薬である 4 mM D-SL を含有させた。UDP-glucuronosyltransferase supersomes における NSAID のグルクロン酸抱合の見かけの K_m 値は 200 μM 以下であるため [110], AG 生成を最大にするために 1 mM NSAID を基質として使用した。プレインキュベーション後 (37°C, 5 min), 反応液に 6 mM UDPGA を添加し反応を開始した。5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 240, 360 min 後に経時的に反応液を 25 μL 採取し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて AG を定量した。IBF

はラット肝ミクロソームで速やかに IBF-AG に変換されるため、反応開始後 2.5, 5, 7.5, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360 min に反応液を採取した。

4) NSAIDs およびアシルグルクロン酸抱合体の定量法

採取した反応液 25 μ L に内部標準物質 (I.S.)を含んだ 4% methanol/phosphoric acid を 100 μ L 加えて反応を停止させ、ミクロソームタンパクを除去し AG の非酵素的分解を防いだ。その後、遠心分離し (10,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 min), 上清を HPLC により測定した。各薬物の測定条件は Table 11 に示した。カラム温度は、すべての条件下で 40 $^{\circ}$ C に設定した。HPLC の装置は Agilent Technologies 1200 Series (Agilent Technologies, Inc., CA, USA)を用いた。移動相はすべてポアサイズ 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過後使用した。

Table 11. HPLC conditions

Compound	Column	Mobile Phase	Flow rate (ml/min)	Wavelength (nm)	Internal standard
DIC-AG	Inertsil C8-3	50 mM phosphate buffer (pH 5.5)/	1.0	254	17 μ M IND
LUM-AG	(4.6 \times 150 mm, 5 μ m, GL Science, Tokyo, Japan)	methanol (45/55)			50 μ M DIC
IBU-AG	Inertsil ODS-2 (4.6 \times 250 mm, 5 μ m, GL Science)	Water/acetonitrile/phosphoric acid (75/25/0.1)	1.5	237	30 μ M IND
TOL-AG	COSMOSIL C18 AR-II	Water/acetonitrile/formic acid (75/25/0.1)	1.0	310	50 μ M ZOM
ZOM-AG	(4.6 \times 150 mm, 5 μ m, Nacalai Tesque)	Water/acetonitrile/phosphoric acid (75/25/0.1)		214	23 μ M TOL 50 μ M ETO
IBF-AG					
KET-AG		20 mM acetate buffer (pH 5.0)/ acetonitrile (75/25)		254	1 mM chlorzoxazone
ETO-AG		50 mM phosphate buffer (pH 5.5)/ methanol (50/50)			20 μ M MEF
MEF-AG	CAPCELLPAK C18 (4.6 \times 150 mm, 5 μ m, OSAKA SODA, Osaka, Japan)	Water/acetonitrile/formic acid (50/50/0.2)			20 μ M DIC

5) 薬物速度論的解析

ラット肝ミクロソーム中における AG の生成と分解に関する速度論的パラメーターは、非線形最小二乗法 (MULTI) を使用して算出した [111]。AG 加水分解酵素阻害薬非存在下 (Inh-) または存在下 (Inh+) の実験データを以下の式にあてはめ、速度論的パラメーターを推定した。

a) AG 加水分解酵素阻害薬非存在下 (Inh-)

$$C_{AG,inh-} = \frac{(100 \times F_{inh-} \times k_f)}{(k_f - k_{dt})} \times (e^{-k_{dt} \times t} - e^{-k_t \times t}) \quad (1)$$

b) AG 加水分解酵素阻害薬存在下 (Inh+)

$$C_{AG,inh+} = \frac{(100 \times F_{inh+} \times k_f)}{(k_f - k_{dn})} \times (e^{-k_{dn} \times t} - e^{-k_t \times t}) \quad (2)$$

ここで、 C_{AG} は反応液中の AG 濃度、 F は親薬物からの AG 変換率、 k_f は親薬物からの一次の AG 生成速度定数、 k_{dt} は一次の AG の分解速度定数、 k_{dn} は AG の非酵素的分解速度定数を表す。AG 加水分解酵素阻害薬は k_f に影響を与えないと仮定し、式 (1) と式 (2) の間で共通の k_f を用いて速度論的パラメーターを推定した。AG 加水分解酵素阻害薬非存在下 (Inh-) と存在下 (Inh+) での AG 分解の違いを Fig. 12 にまとめた。また、反応液中濃度時間曲線下面積 (AUC: nmol/mg protein · min) を算出した。

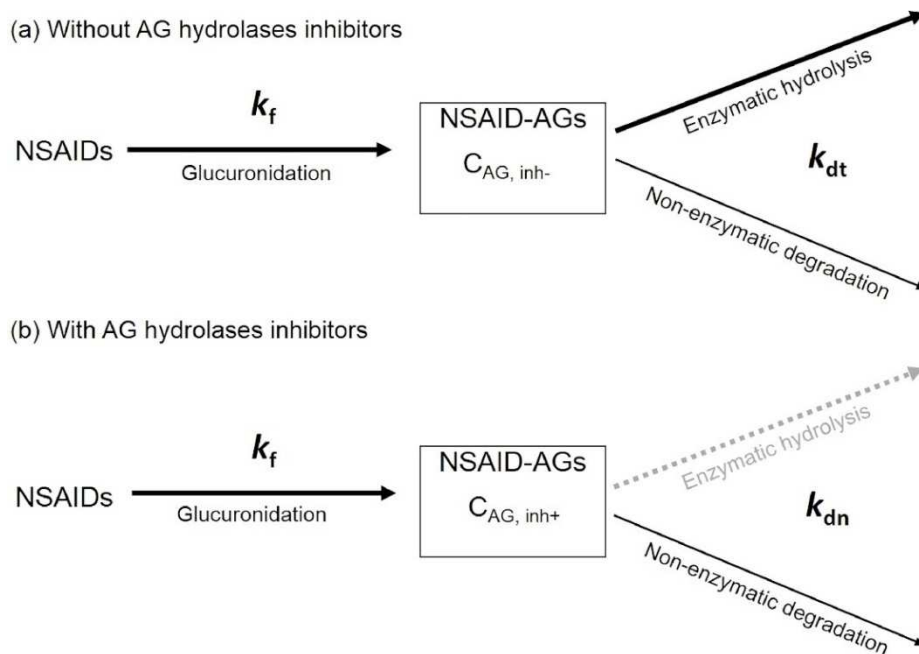


Fig. 12. Schematic representation of a one-compartment model with first-order formation and disappearance phases of the NSAID-AG concentration in rat liver microsomes

(a) In the absence of AG hydrolase inhibitors, the NSAID-AG concentration in rat liver microsomes ($C_{AG, inh-}$) depends on glucuronidation (k_f , rate constant of AG formation) and disappearance, which comprises enzymatic hydrolysis and non-enzymatic degradation (k_{dt} , rate constant of total AG disappearance). (b) In the presence of AG hydrolase inhibitors, the NSAID-AG concentration in rat liver microsomes ($C_{AG, inh+}$) depends on glucuronidation (k_f) and non-enzymatic disappearance (k_{dn} , rate constant of non-enzymatic AG disappearance).

第3節 実験結果

1) ラット肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の生成と消失の経時変化

NSAID-AGs の β -glucuronidase および esterase を介した酵素的分解および非酵素的分解を区別して評価するために、AG 加水分解酵素阻害薬である PMSF および D-SL の非存在下 (Inh-) および存在下 (Inh+) で、ラット肝ミクロソーム中における AG の生成および消失量を経時的に評価した。AG 加水分解酵素阻害薬存在下 (Inh+)、検討したすべての NSAIDs で AG 生成量が有意に増加した (Fig. 13)。AG 加水分解酵素阻害薬非存在下 (Inh-) では、反応開始後 120 min で、ほぼすべての AG が検出できないレベルまで減少した。一方、AG 加水分解酵素阻害薬存在下 (Inh+) では、反応開始後 360 min まで AG の検出は可能であった。

つぎに、AG 加水分解酵素の立体選択性の有無を検討するため、臨床においてラセミ体で用いられる KET および IBU についてラット肝ミクロソーム中における AG の生成および消失量を経時的に評価した (Figs. 13h and i)。AG 累積生成量は S-体 (S-KET および S-IBU) において R-体 (R-KET および R-IBU) より大きいことが示されたが、AG 加水分解酵素阻害薬存在下 (Inh+) および非存在下 (Inh-) における AG の消失に顕著な差は見られなかった。

以上より、NSAIDs ごとに AG の累積生成量や、AG 加水分解酵素阻害薬存在下 (Inh+) および非存在下 (Inh-) における AG 消失量に著しい差があることが示された。また、KET および IBU の R-体および S-体間で AG 加水分解酵素阻害薬存在下

(Inh+)および非存在下 (Inh-)における AG の消失に顕著な差は見られなかったことから, AG 加水分解酵素の立体選択性は認められなかった。

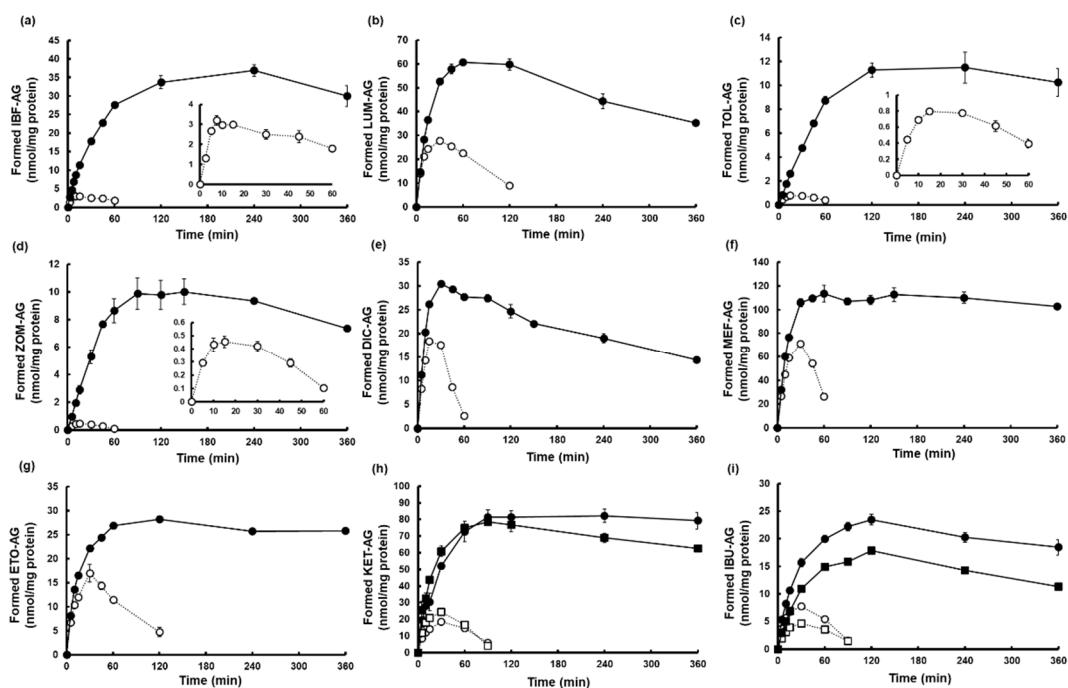


Fig. 13. Time courses of formation and disappearance of NSAID-AGs in rat liver microsomes

Ibuprofen (a), lumiracoxib (b), tolmetin (c), zomepirac (d), diclofenac (e), mefenamic acid (f), etodolac (g), ketoprofen (h), and ibuprofen (i) were incubated with rat liver microsomes in the absence (white circles and squares) or presence (black circles and squares) of AG hydrolase inhibitors. AG amounts of ibuprofen (a), tolmetin (c), and zomepirac (d) are expanded as inserts. *R*-Ketoprofen and *R*-ibuprofen are shown as squares, whereas *S*-ketoprofen and *S*-ibuprofen are shown as circles (h and i). Data are presented as the mean \pm SEM ($n = 3$).

2) アシルグルクロン酸抱合体量と特異体質性毒性リスクとの関連性

反応液中で生成した AG 量と NSAIDs の IDT リスクとの関連性を検討するために、ラット肝ミクロソーム中での AG 生成および消失の経時変化を利用して AG の AUC を算出した。AG 加水分解酵素阻害薬非存在下 (Inh-)における WDN 群の AUC_{inh-} は、LUM を除き WA 群および SA 群よりも低い傾向にあったが (Fig. 14a), AG 加水分解酵素阻害薬存在下 (Inh+)での WDN 群の AUC_{inh+} は WA 群および SA 群と同等のレベルまで増加した (Fig. 14b)。そこで次に、AG 加水分解酵素阻害により NSAIDs の IDT リスクのカテゴリごとに、どの程度 AG 量が増加したかを明らかにするため、 AUC_{inh+} に対する AUC_{inh-} の AUC 比を算出した。LUM を除く WDN 群の AUC_{inh+}/AUC_{inh-} 比は、WA 群および SA 群よりも顕著に高かった (Fig. 14c)。

以上の結果から、毒性発現により市場撤退した WDN 群では、WA 群および SA 群と比較して AG 加水分解酵素阻害により顕著に反応液中 AG 量が増大することが明らかとなった。

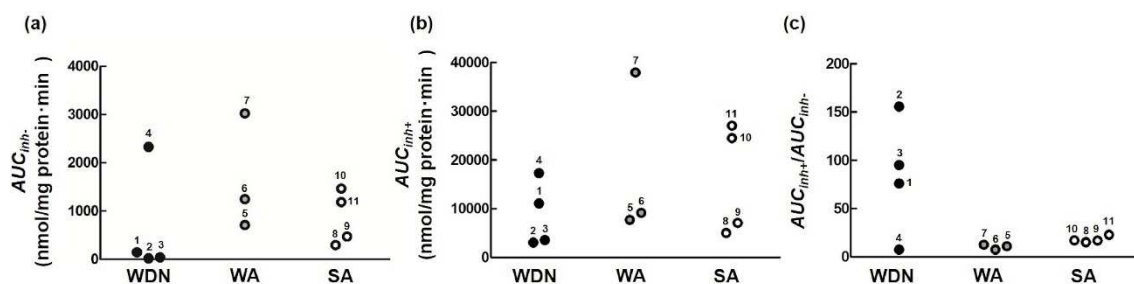


Fig. 14. Area under AG concentration-time curve in rat liver microsomes

The area under the AG concentration–time curve (AUC) was calculated from the time courses of the formation and degradation of AGs in rat liver microsomes in the absence (AUC_{inh-} , a) or presence (AUC_{inh+} , b) of AG hydrolase inhibitors. The effect of AG hydrolase inhibitors is indicated as the ratio of AUC_{inh+} to AUC_{inh-} (c). Drugs were classified into three groups according to IDT risk: withdrawn (WDN), warning (WA), and safe (SA). Numbers with symbols indicate the names of AGs as follows: 1, ibufenac AG; 2, zomepirac AG; 3, tolmetin AG; 4, lumiracoxib AG; 5, diclofenac AG; 6, etodolac AG; 7, mefenamic acid AG; 8, *R*-ibuprofen AG; 9, *S*-ibuprofen AG; 10, *R*-ketoprofen; 11, *S*-ketoprofen.

3) ラット肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の生成と消失の速度論的パラメーター

検討した NSAIDs の AG の生成, 酵素的加水分解, 非酵素的分解の程度を比較するために, AG 加水分解酵素阻害薬非存在下 (Inh-) および存在下 (Inh+) のラット肝ミクロソーム中における AG 生成および消失の経時変化から, AG 生成と分解の一次速度定数を推定した。AG の k_f は WDN 群, WA 群および SA 群で同程度であった (Fig. 15a)。LUM を除く WDN 群の AG の k_{dt} は, WA 群および SA 群よりも顕著に高かった (Fig. 15b)。WDN 群の k_{dn} は, WA 群および SA 群の k_{dn} とほぼ同じであった (Fig. 15c)。また, F_{inh-} および F_{inh+} は 3 群間で顕著な差は認められなかった (Fig. 15d and e)。

これらの結果から, AG 生成の程度は WDN 群, WA 群および SA 群間で顕著な差は見られなかった一方, WDN 群の AG は, WA 群および SA 群の AG と比較して, ラット肝ミクロソーム中で β -glucuronidase および esterase によって加水分解されやすいことが示唆された。

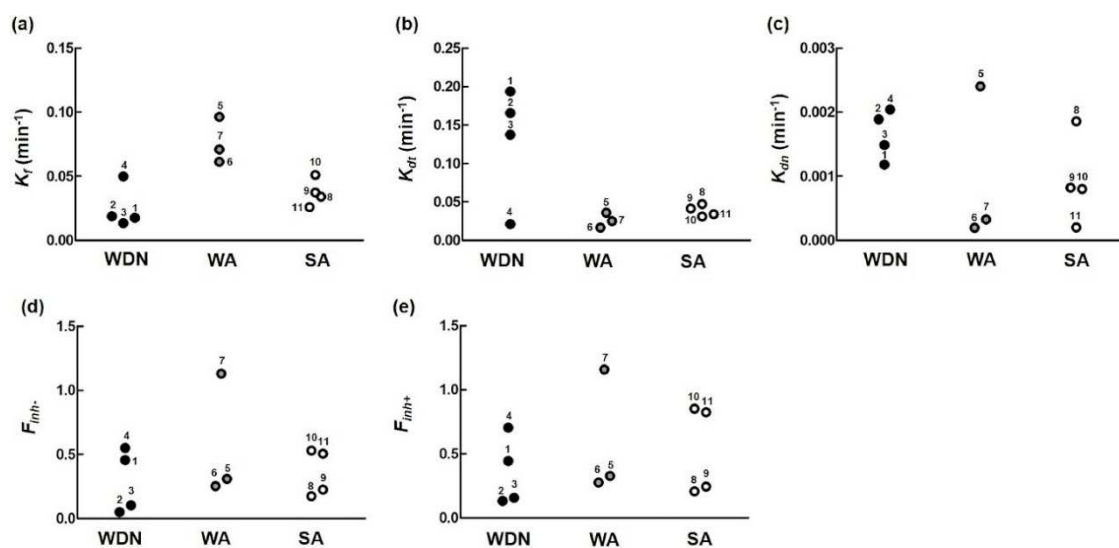


Fig. 15. Kinetic parameters of formation and degradation of NSAID-AGs in rat liver microsomes

Kinetic parameters k_f (a), k_{dt} (b), k_{dn} (c), F_{inh-} (d), and F_{inh+} (e) were calculated from the time courses of the formation and disappearance of AGs in rat liver microsomes. Classification according to IDT risk and number of AGs is the same as that in Fig. 14.

第4節 考察および小括

NSAIDs による IDT 発症は主に肝代謝により生成される AG が原因の一つと考えられている。AG の化学的不安定さは、DILI を含む IDT のリスクと関連することが示唆されている [19, 98]。従来, AG の化学的不安定さはリン酸緩衝液中やヒト血清アルブミンに AG を直接添加することで評価してきた。しかし, AG は化学合成が難しく, 調製するには時間を要する。さらに, 薬物によって組織内での AG の酵素的生成・分解の程度は異なるが, 従来の方法では AG 生成量の違いや組織中における加水分解酵素による分解が考慮されていない。そこで第2章では, ラット肝ミクロソーム中における AG の生成, 酵素的分解, および化学的不安定性を同時に評価することを試みた。肝ミクロソーム中には UGT に加え, β -glucuronidase と a/b hydrolase domain containing 10 (ABHD10)を含むいくつかの esterase が含有されるため, AG の生成と加水分解酵素による分解の両方を考慮することができる。さらに, β -glucuronidase 阻害剤 D-SL および esterase 阻害剤 PMSF を用いることで, AG の化学的不安定性も評価可能と考えた。したがって, 本方法では AG をあらかじめ調製することなく AG の生成, 加水分解酵素による分解, 化学的安定性について評価できる利点がある。

β -glucuronidase および esterase を介した AG の酵素的加水分解と AG の非酵素的分解を区別して評価するために, ラット肝ミクロソームにおける D-SL および PMSF の AG 加水分解酵素阻害薬存在下 (Inh+)または非存在下 (Inh-)での AG の生成と分解について検討した (Fig. 13)。検討したすべての NSAIDs について, AG 加水分解酵素阻害薬非存在下 (Inh-)ではラット肝ミクロソーム中の AG は最大

濃度に達した後、速やかに消失した。一方,AG 加水分解酵素阻害薬存在下 (Inh+) では累積 AG 生成量は AG 加水分解酵素阻害薬非存在下 (Inh-)と比較して顕著に増加し,高い AG 濃度で維持された。したがって,AG の酵素的加水分解のほとんどは, D-SL および PMSF によって阻害されることが示唆された。

AG 加水分解酵素による立体選択性の有無を検討する目的で,臨床でラセミ体として使用されている KET および IBU について S-体, R-体それぞれでラット肝ミクロソームにおける AG 加水分解酵素阻害薬存在下 (Inh+)および非存在下 (Inh-)での AG の生成と分解を検討した (Figs. 13h and i)。AG の生成量は S-体 (S-KET および S-IBU)で R-体 (R-IBU および S-IBU)より高値を示したが,酵素による分解されやすさに明確な立体選択性は見られなかった。Iwaki らのグループではラット肝ミクロソーム中で S-IBU は R-IBU と比較して AG を生成しやすいことを報告しており [112], 本検討の IBU-AG 生成における立体選択性と一致した。KET および IBU 以外にも多くの NSAIDs がラセミ体として臨床で用いられていることから,今後さらに加水分解酵素による分解性における立体選択性の有無を評価する必要がある。

ラット肝ミクロソーム中で生成した AG 量と NSAIDs の IDT リスクとの関連性を検討するために,加水分解酵素阻害により NSAIDs ごとに,どの程度 AG 量が増加したかを明らかにするため,AG 加水分解酵素阻害薬存在下 (Inh+)に対する AG 加水分解酵素阻害薬非存在下 (Inh-)の AUC 比を算出した。WA 群および SA 群の AUC_{inh+}/AUC_{inh-} 比は約 15 であった (Fig. 14c)。一方,WDN 群の ZOM, TOL, IBF の AUC_{inh+}/AUC_{inh-} 比は,それぞれ 156, 95, 76 であった。これらの結果か

ら, AG 加水分解酵素の活性が低下することにより ZOM, TOL, IBF の生体内 AG 量は容易に増大することが想定される。実際, マウスに ZOM を esterase 阻害薬およびグルタチオン合成阻害薬とともに投与すると, AG の蓄積とともに急性腎障害が起こる [27]。したがって, AG の酵素的加水分解の阻害あるいは遺伝的欠損による AG 加水分解酵素活性の低下が WDN 群の毒性増大に影響を与える重要な因子であることが示唆される。肝臓や腎臓における β -glucuronidase の活性は, 酵素の発現量の違いから, ヒトによって大きく異なる [113]。しかし, AG 加水分解酵素として寄与する esterase の一種であるヒト a/b hydrolase domain containing 10 (ABHD10)における個人差は不明である [114, 115]。 β -glucuronidase や ABHD10 の個人差は WDN 群の AG の体内動態を変化させることで IDT の発症に影響する可能性があるため, さらなる詳細な検討が必要である。

検討した NSAIDs の AG の生成, 酵素的加水分解, 非酵素的分解の程度を比較するために, AG 加水分解酵素阻害薬非存在下 (Inh-)および存在下 (Inh+)のラット肝ミクロソーム中における AG 生成および消失の経時変化から, AG 生成と分解の速度定数を推定した (Fig. 15)。Fig. 12 に示すように, AG 加水分解酵素阻害薬非存在下 (Inh-)における AG 分解速度定数は, 酵素的加水分解と非酵素的分解の和である総分解速度定数 (k_{dt}), AG 加水分解酵素阻害薬存在下 (Inh+)での AG 分解速度定数は, 非酵素的分解速度定数 (k_{dn})として算出した。 k_{dn} は無視できるほど小さいため (Figs. 15b and c), k_{dt} を酵素的加水分解速度定数とみなした。AG の k_f は WDN 群, WA 群および SA 群で同程度であったが (Fig. 15a), LUM を除く WDN 群の AG の k_{dt} は, WA 群および SA 群よりも有意に高かった (Fig. 15b)。加水分解酵素を含むヒト血清アルブミンおよび血漿中では, IBF-AG は IBU-AG より

も急速に消失する [116]。さらに, IBF-AG の血漿中濃度は IBU-AG よりも急速に減少するが, 同量の IBF と IBU を投与した場合, IBF の血漿中濃度は IBU よりも高く維持される。これらの報告は, WDN 群は WA 群や SA 群に比べて AG 生成量が少なく, β -glucuronidase や esterase による加水分解の程度が高いことを示した本研究のデータを支持した (Fig. 15b)。

リン酸緩衝液や Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4, 37°C)などの無機緩衝液における AG の半減期は, IDT リスクとよく相関することが示唆されている [98, 106]。本研究では, k_{dn} は AG の化学的不安定性を反映すると予想されたが, WDN 群, WA 群, および SA 群の薬物間で顕著な差は認められなかった (Fig. 15c)。ZOM, TOL, IBF, DIC の AG は半減期が短く [98, 106, 117], 1 時間以内に初期濃度の半分まで減少するが, 本研究で k_{dn} から算出した半減期は 5 時間以上であった。本研究では, AG は 1-O- β -AG とその位置異性体との和とみなした。カルボキシ基を有する薬物は UGT によって 1-O- β -AG に変換されるが, 1-O- β -AG は非酵素的にアシル転移を起こし [99], 1-O- β -AG 量が減少する原因となる。これまでは 1-O- β -AG の消失量から AG の半減期を推定していたが, 本研究では 1-O- β -AG とその位置異性体の量を別々に評価しなかった。1-O- β -AG とその位置異性体はともにタンパク質と共有結合してタンパク質付加体を形成するため, IDT リスクを予測するためには 1-O- β -AG とその位置異性体の合計として AG 量を評価すべきであると考えた。アシル転移した位置異性体は 1-O- β -AG に比べて化学的に安定しているため [117], 1-O- β -AG とその位置異性体の合計から求められる AG の消失率は, 1-O- β -AG のみから求められる消失率より低いはずである。本研究では, IDT リスク

と 1-O- β -AG とその位置異性体の化学的不安定性を反映した k_{dn} の間に相関は見られなかった。

これまでに IDT リスクと AG の安定性の関係については多くの研究がなされている [118]。AG の安定性は化学構造に依存するため [119-121]、IDT リスクは AG を生成する薬物の構造との関連性が高い。Fig. 11 に示すように、検討した NSAIDs はその化学構造からフェニル酢酸 (IBF, LUM, DIC)、ピロール酢酸 (ZOM, TOL)、フェニルプロピオン酸 (IBU, KET)、その他 (MEF, ETO) に分類することができる。フェニルプロピオン酸の AG は、 α 炭素原子上のメチル基によるカルボキシ基への立体障害のため、アリール酢酸 (フェニル酢酸やピロール酢酸など) の AG よりも化学的に安定している [122, 123]。同様に、ETO の AG は、カルボキシ基の β 炭素原子上に嵩高い置換基を有し、他の AG と比較して比較的安定である [119]。安息香酸の AG の安定性はアリール酢酸と同様であるが、MEF のような安息香酸へのオルト置換は立体効果により安定性を高める [124]。したがって、IBU, KET, MEF, ETO はアリール酢酸に比べ、カルボキシ基周辺の立体的効果が大きいと思われる。 β -glucuronidase や esterase は加水分解のために AG のカルボニル炭素を認識する必要があるため、カルボキシ基周辺の立体障害が酵素の認識を難しくしている可能性がある。ZOM, TOL, IBF はアリール酢酸構造を有しており、このような構造を有する親薬物由来の AG は、AG 加水分解酵素の基質として認識されやすい可能性がある。本研究でも、LUM を除く WDN 群である ZOM, TOL, IBF の AG の k_{dt} は、WA 群および SA 群よりも顕著に高かった (Fig. 15b)。アリール酢酸構造を持つ DIC と LUM の k_{dt} 値が他の薬物と同程度であった理由は不明であるが、カルボキシ基と芳香環上の置換基の局在が、AG

の β -glucuronidase および esterase の基質としての認識に影響を及ぼした可能性がある。フェニル酢酸のうち, IBF はパラ位に置換基を有するが, DIC と LUM はオルト位に置換基を有する。ZOM および TOL は同様の位置にメチル基を有するが, DIC および LUM のオルト位置換基のジハロゲンアニリンの立体障害は, ZOM および TOL のメチル基によるものよりも大きい。従って, DIC と LUM は, IBF, ZOM, TOL よりも立体障害が大きいと考えられる。カルボキシ基と芳香環上の置換基の局在が, β -glucuronidase や ABHD10 を含む esterase の基質としての認識に与える影響については, さらなる検討が必要である。しかし, 化学的安定性の結果と一致して, 立体障害の少ないアリール酢酸の AG は容易に加水分解され, IDT リスクが高いと考えられた。以上のことから, 新規薬剤候補を開発する際には, カルボン酸の基本構造と置換基の位置, 数, および嵩高さを IDT リスクの決定要因として考慮する必要がある。

第 2 章の結論として, 肝ミクロソームで AG を生成することにより, AG の酵素分解性および化学的不安定性を同時に評価することができた。本方法では, AG を調製する必要なく AG の分解を評価することが可能である。IDT リスクの高い薬物の AG では, ラット肝ミクロソーム中で β -glucuronidase や esterase により加水分解されやすいことが示唆され, ラット肝ミクロソームにおける AG の酵素的分解と IDT リスクとの関係を明らかにした。 β -glucuronidase や esterase により加水分解されやすい薬物は, これらの酵素の個人差により, IDT のリスクが高くなる可能性がある。したがって, AG の酵素的加水分解の程度は, 新規薬剤候補の IDT のリスクを決定する要因になる可能性がある。

第3章 ヒトおよびラット肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の加水分解の種差

第1節 緒言

第2章では、特異体質性毒性 (IDT) リスクの高い薬物のアシルグルクロン酸抱合体 (AG) がラット肝ミクロソーム中で β -glucuronidase や esterase により加水分解されやすいことが示唆された。ほとんどの AG は、 β -glucuronidase やいくつかの esterase などの酵素によって加水分解される [125-128]。様々な esterase の中で、a/b hydrolase domain containing 10 (ABHD10) と acylpeptide hydrolase (APEH) は共に AG 加水分解酵素として機能することが分かっている [115, 129]。Iwamura らは、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) である zomepirac (ZOM) を、esterase 阻害薬である tri-*o*-tolyl phosphate とマウスに併用投与することにより、血漿、肝、腎の ZOM-AG レベルが上昇し、急性腎臓障害を誘発すると報告している [27]。したがって、AG 加水分解酵素活性の低下による組織への AG の蓄積は、IDT リスクの要因と考えることができる。しかし、第2章では、ラット肝ミクロソームを使用したため、本方法が IDT リスク評価に利用できることをさらに確認するためには、ラット肝ミクロソーム (RLM) とヒト肝ミクロソーム (HLM) における AG 加水分解特性の種差について検討する必要がある。また、AG 産生に関与する UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) におけるヒトと動物の種差に関する多くの研究報告があるが [130-135]、AG 消失に関与する AG 加水分解の種差に関する情報は少ない。

そこで、第3章では、肝ミクロソームにおけるAG加水分解に着目し、ヒトおよびラット肝ミクロソームのAG加水分解における種差を明らかにすることを目的とした。HLMおよびRLMにおけるAG加水分解の特徴を明らかにするために、化学構造に基づいてピロール酢酸、フェニル酢酸およびその他の3つに分類される6種類のNSAIDsを使用した (Fig. 16)。AG加水分解速度およびAG加水分解における β -glucuronidaseおよびesteraseの寄与について検討した。

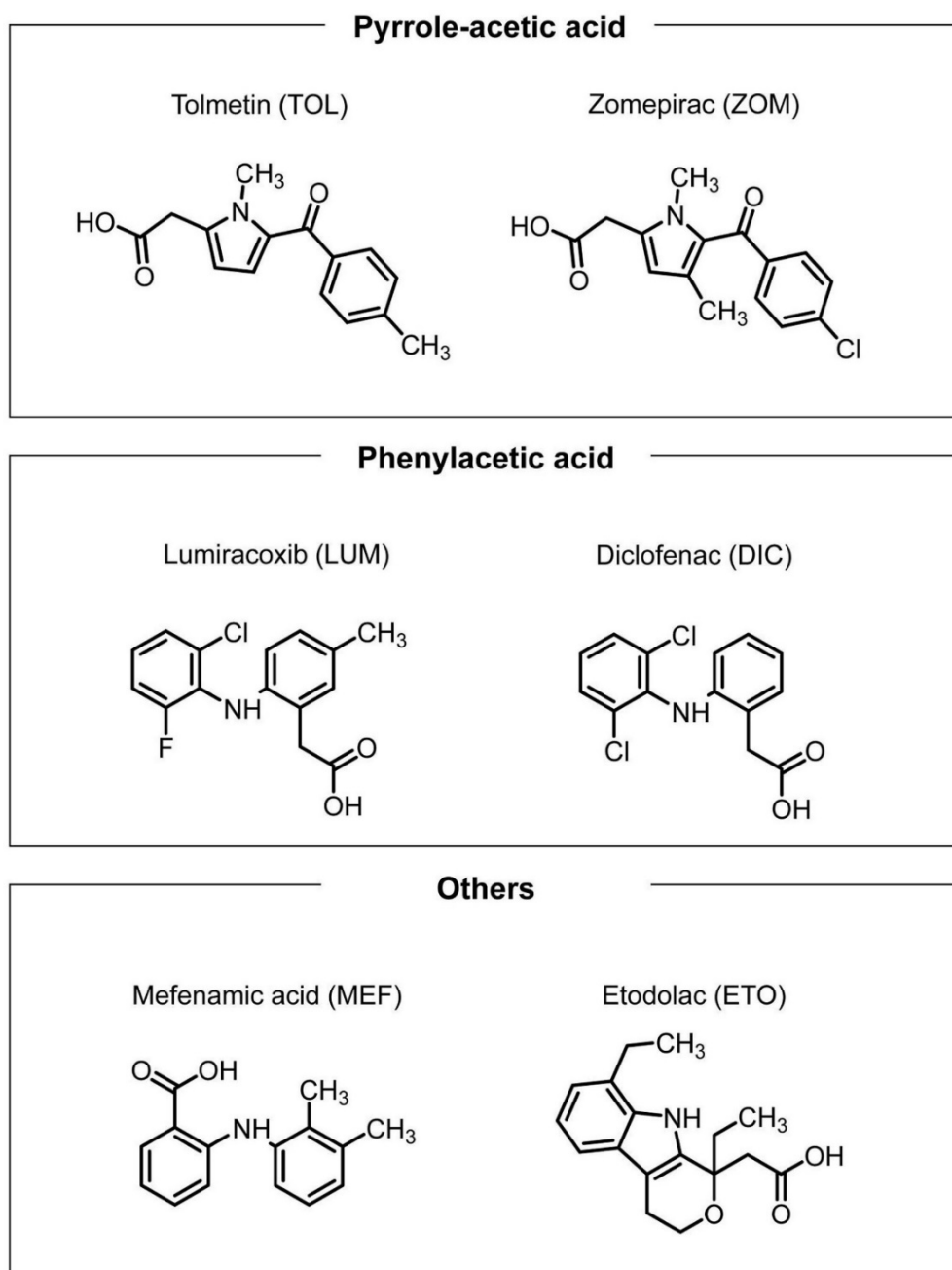


Fig 16. Chemical structures of NSAIDs are investigated in this study
NSAIDs are categorized according to their chemical structure as pyrrole-acetic acid, phenylacetic acid, and others.

第2節 実験材料および方法

1) 実験材料

Diclofenac (DIC), zomepirac (ZOM)および D-saccharic acid 1,4-lactone (D-SL)は, Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA) から購入した。Lumiracoxib (LUM)および etodolac (ETO)は, Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)は, ナカライテスク株式会社 (京都) から調達した。Tolmetin (TOL), mefenamic acid (MEF), LUM-AG, TOL-AG, DIC-AG, ZOM-AG および MEF-AG は, Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) より入手した。ETO-AG は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)から購入した。Sprague-Dawley (SD)系雄性ラットからプールした RLM (Gentest Rat Pooled Liver Microsomes, product number 452501)および 74 人の男性と 76 人の女性の白人ドナーからプールした HLM (UltraPool HLM 150, product number 452117) を Corning Life Sciences (Glendale, AZ, USA) から購入した。その他, 試薬はすべて試薬特級品または HPLC 用試薬を使用した。

2) 肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の加水分解実験

100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)中に 0.3 mg/ml HLM もしくは RLM を含む反応液をプレインキュベーション後 (37°C, 5 min), 各 NSAID-AG を 50 μ M になるよう添加し, 加水分解反応を開始した。経時的 (各 6 時点)に反応液 25 μ L を採取し, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)を用いて親薬物の NSAIDs を定量した。

3) 肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の加水分解に対する β -glucuronidase および esterase の寄与

反応液 (100 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.4, 0.3 mg/ml HLM および RLM) に 1 mM PMSF, 10 mM D-SL の一方もしくは両方を含有させた。プレインキュベーション後 (37°C, 5 min), 50 μ M になるよう NSAID-AG を添加し反応を開始させた。所定時間後 (TOL と ZOM は 5 min, LUM と DIC は 20 min, MEF は 60 min, ETO は 120 min), 反応液 25 μ L を採取し, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて親薬物の NSAIDs を定量した。

4) NSAIDs の定量法

採取した反応液 25 μ L に内部標準物質を含んだ 4% methanol/phosphoric acid を 100 μ L 加えて反応を停止させ, ミクロソームタンパクを除去し AG の非酵素的分解を防いだ。その後, 遠心分離し (10,000 \times g, 4°C, 10 min), 上清を HPLC により測定した (Table 12)。カラム温度は, すべての条件下で 40°C に設定した。HPLC の装置は Shimadzu HPLC-20A series (株式会社島津製作所, 京都) を用いた。移動相はすべてポアサイズ 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過後使用した。

Table 12. HPLC conditions

Compound	Column	Mobile Phase	Flow rate (mL/min)	Wavelength (nm)	Internal standard
DIC	Inertsil C8-3 (4.6 × 150 mm, 5 μm, GL Science, Tokyo, Japan)	50 mM phosphate buffer (pH5.5)/MeOH (45/55)	1.0	282	3 μM TOL
TOL	COSMOSIL C18 AR-II (4.6 × 150 mm, 5 μm, Nacalai Tesque)	Water/acetonitrile/formic acid (65/35/0.1)	1.0	310	50 μM ZOM
ZOM		Water/acetonitrile/formic acid (65/35/0.1)	1.0	320	1 μM TOL
LUM		Water/acetonitrile/formic acid (58/42/0.1)	1.0	254	10 μM DIC
MEF		Water(A)/acetonitrile(B)/formic acid (55/45/0.2) Gradient method, 0-16 min (B) 45%→55%, 16-20 min (B) 55%, 20-30 min (B) 45%	1.0	254	10 μM DIC
ETO		50 mM potassium phosphate buffer/MeOH (48/52)	1.0	254	10 μM MEF

5) 薬物速度論的パラメーターの算出

AG の加水分解速度は, AG 加水分解による親薬物生成の経時変化から算出した (反応開始から線形に親薬物が生成されるまでの時間内, それぞれ TOL と ZOM は 5 min 後, LUM と DIC は 20 min 後, MEF は 60 min 後, ETO は 120 min 後の親薬物生成量から算出)。また, RLM および HLM で観察された AG 加水分解 (e.g. 非酵素的+酵素的 AG 加水分解) による親薬物生成量からミクロソーム非存在下で観察された AG 加水分解 (e.g. 非酵素的 AG 加水分解) による親薬物生成量を差し引き, RLM および HLM における酵素的 AG 加水分解速度を推定した。

6) 統計解析

実験結果はすべて各群の平均値 \pm 標準偏差 (S.D.) で示した。肝ミクロソーム中 AG 加水分解の有意差検定は, 分散分析の後に Student's t-test または Dunnett's test を行い, $p < 0.05$ を統計的有意差ありと判断した。検定の計算には解析ソフトウェア GraphPad Prism version 9.3.1 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) を使用した。

第3節 実験結果

1) ヒトおよびラット肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の加水分解

各 NSAID-AG の HLM および RLM 中での加水分解特性を明らかにするために、Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中に HLM もしくは RLM を含む反応液中で AG 加水分解により生成する親薬物を経時的に測定した (Fig. 17)。その結果、TOL-AG, ZOM-AG, LUM-AG, DIC-AG は HLM および RLM 中で緩衝液中と比較して顕著に加水分解されることが確認された (Figs. 17a-d)。MET-AG と ETO-AG は RLM で著しく加水分解されたが、HLM での AG 加水分解は緩衝液中と同程度であった (Figs. 17e and f)。HLM と RLM における AG 加水分解速度を Table 13 に示す。ZOM-AG, MEF-AG, ETO-AG は、RLM において HLM よりも顕著に速い AG 加水分解速度を示した。ヒトとラット間で ZOM-AG と DIC-AG の AG 加水分解速度は 2 倍以内の差であったが、MEF-AG, ETO-AG では RLM において HLM の 10 倍から 20 倍速い AG 加水分解速度を示した。

これらの結果から、MEF-AG および ETO-AG のようないくつかの NSAID-AG の肝ミクロソーム中の加水分解の程度には、ラットとヒトの間で顕著な種差があることが示唆された。

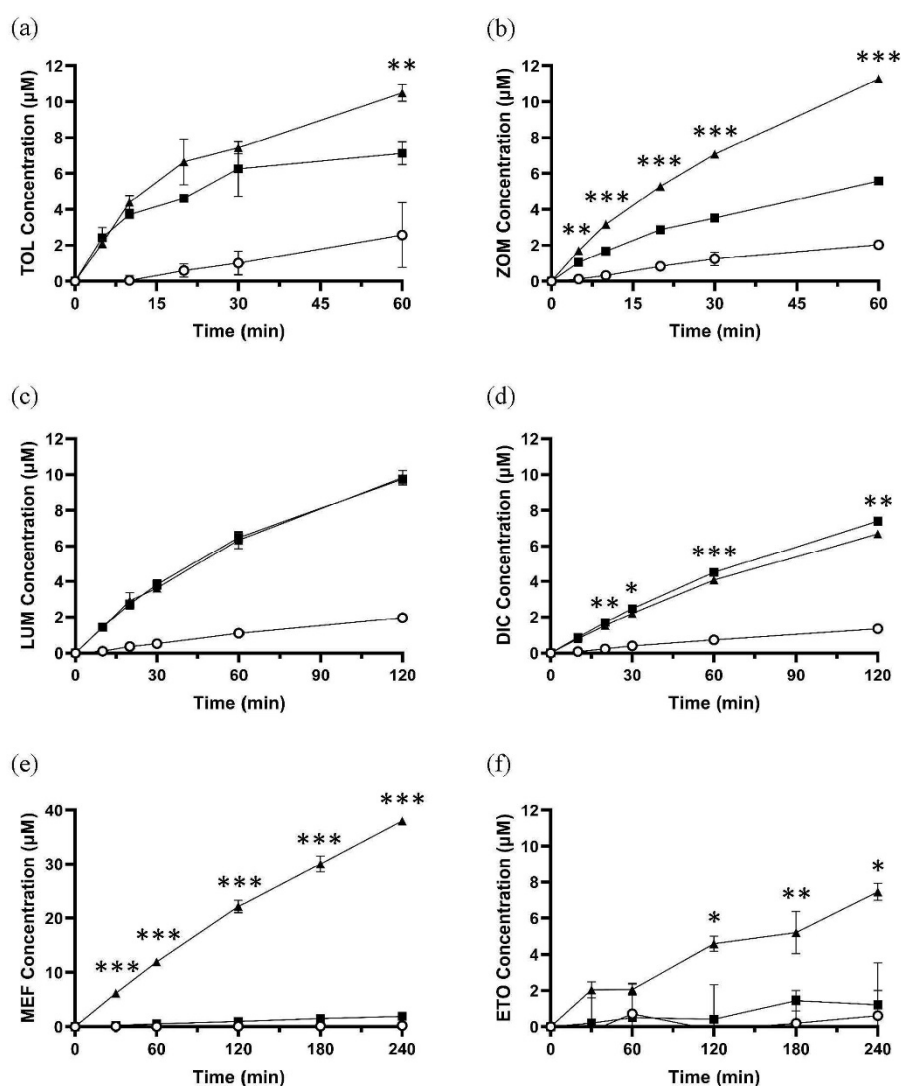


Fig 17. Time courses of the parent drug production by AG hydrolysis in HLM and RLM

TOL-AG (a), ZOM-AG (b), LUM-AG (c), DIC-AG (d), MEF-AG (e), and ETO-AG (f) were incubated in Tris-HCl buffer (pH 7.4) in the absence (open circles), or presence of 0.3 mg/mL HLM (closed squares), or RLM (closed triangles) at 37°C. Data are presented as the mean \pm S.D. (n = 3). Significant differences between the HLM and RLM are shown (* p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001).

Table 13. Estimated hydrolysis rate of AGs in HLM and RLM

Compound	Estimated hydrolysis rate (nmol/min/mg protein)	
	HLM	RLM
TOL-AG	1.578 ± 0.437	1.366 ± 0.132
ZOM-AG	0.616 ± 0.064	1.047 ± 0.052*
LUM-AG	0.394 ± 0.014	0.424 ± 0.084
DIC-AG	0.245 ± 0.012	0.216 ± 0.015*
MEF-AG	0.028 ± 0.007	0.660 ± 0.017*
ETO-AG	0.009 ± 0.052	0.120 ± 0.004*

Data are expressed as the mean ± S.D.(n = 3)

* $p < 0.05$ compared with HLM.

2) ヒトおよびラット肝ミクロソームにおけるアシルグルクロン酸抱合体の加水分解に対する β -glucuronidase および esterase の寄与

HLM および RLM における AG 加水分解に寄与する酵素を明らかにするために、HLM および RLM における AG 加水分解に対する β -glucuronidase および esterase 阻害の影響を検討した。HLM では、TOL-AG, ZOM-AG, LUM-AG および DIC-AG の加水分解は esterase 阻害剤 PMSF により顕著に抑制された (Figs. 18a-d)。 β -glucuronidase 阻害剤である D-SL は、HLM 中の ZOM-AG と DIC-AG の加水分解をわずかに阻害したが (Figs. 18b and d), TOL-AG と LUM-AG の加水分解には影響を与えなかった (Figs. 18a and b)。RLM では、TOL-AG, ZOM-AG, LUM-AG および DIC-AG の加水分解は、D-SL と PMSF の両方により有意に抑制された (Figs. 19a-d)。また、RLM 中の MEF-AG および ETO-AG の加水分解は D-SL により著しく抑制されたが、PMSF は影響を及ぼさなかった (Fig. 19e and f)。

以上より、肝ミクロソームにおける AG の加水分解活性における β -glucuronidase と esterase の寄与が、ヒトとラットで異なることが示された。

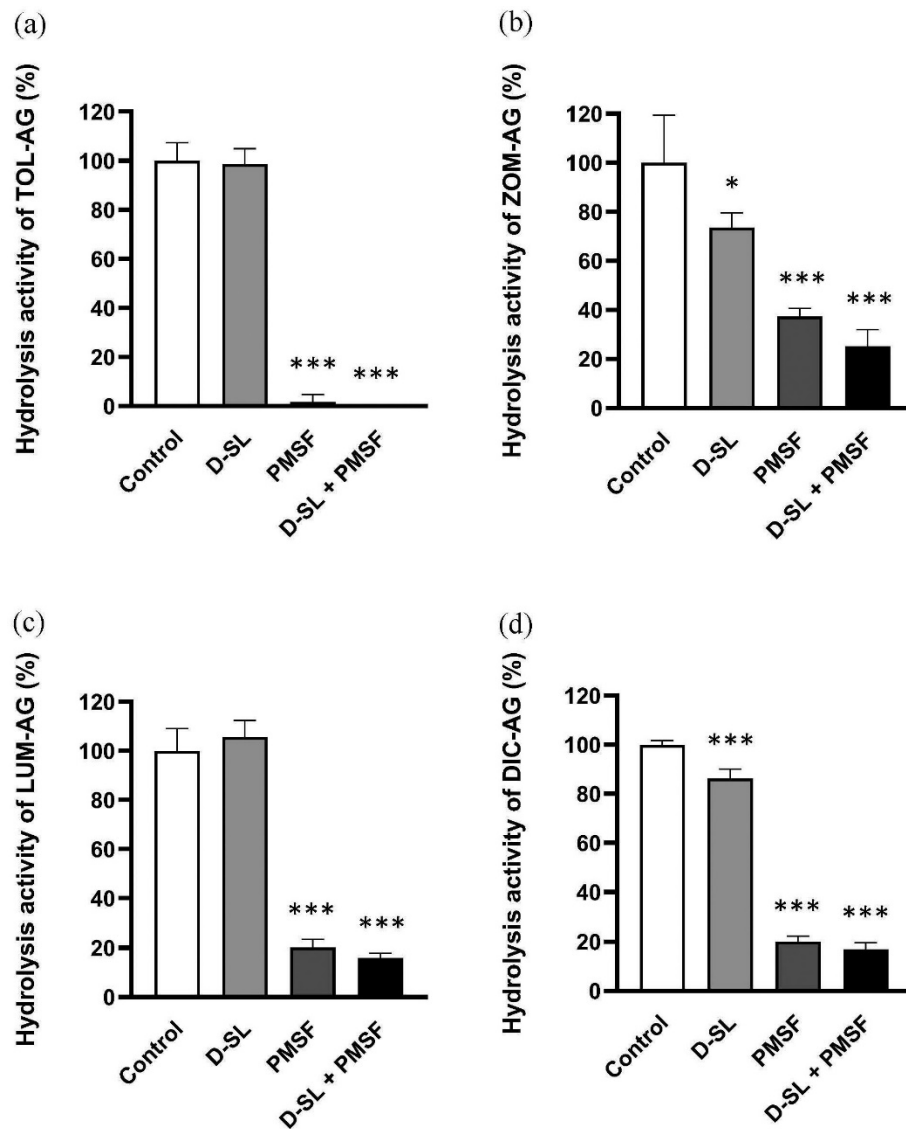


Fig 18. Effects of AG hydrolase inhibitors on AG hydrolysis in HLM

TOL-AG (a), ZOM-AG (b), LUM-AG (c), and DIC-AG (d) were incubated in 0.3 mg/mL HLM-containing Tris-HCl buffer (pH 7.4) in the absence or presence of 10 mM D-SL and/or 1 mM PMSF in 37°C. Each column represents the mean \pm S.D. (n = 3). Significant differences compared to the control, are shown (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$).

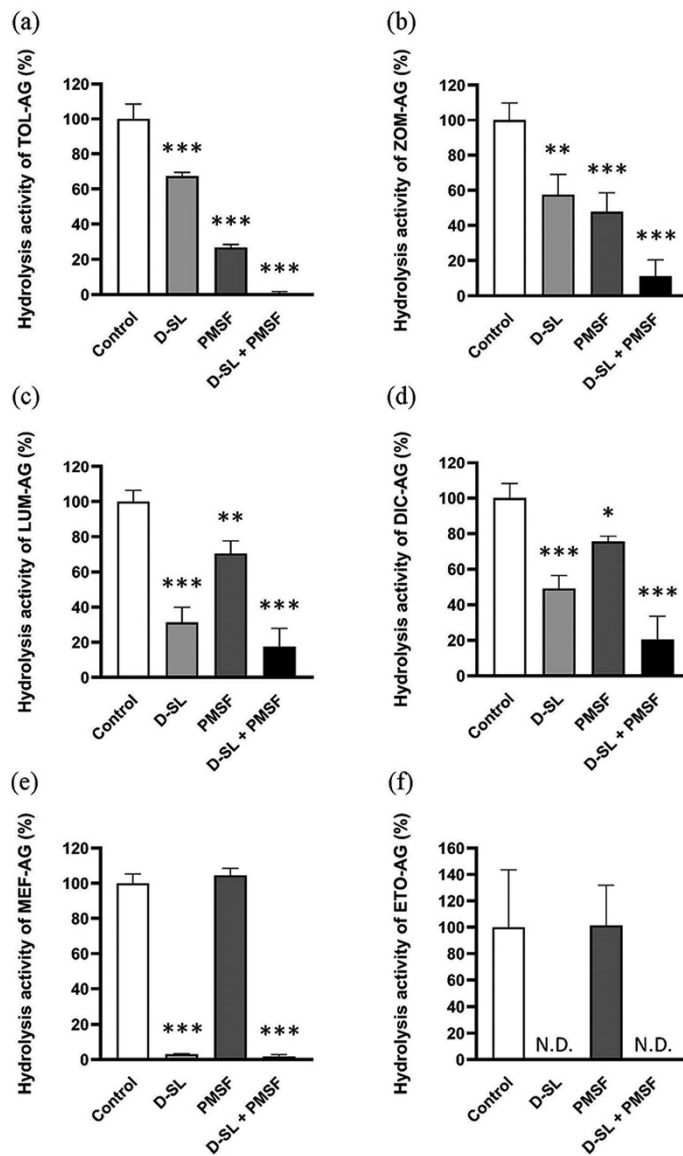


Fig 19. Effects of AG hydrolase inhibitors on AG hydrolysis in RLM

TOL-AG (a), ZOM-AG (b), LUM-AG (c), DIC-AG (d), MEF-AG (e), and ETO-AG (f) were incubated in 0.3 mg/mL RLM-containing Tris-HCl buffer (pH 7.4) in the absence or presence of 10 mM D-SL and/or 1 mM PMSF in 37°C. Each column represents the mean \pm S.D. (n=3). Significant differences compared to the control, are shown (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$). N.D. means not detected.

第4節 考察および小括

RLM における AG の生成量が、薬物のタンパク質への共有結合の程度を決定する重要な要因のひとつであると考えられる [23]。さらに第2章では、RLM における酵素的な AG 加水分解が、ヒトにおける薬物の IDT リスクと関連することを示した。これまでに UGT を介した AG の生成が実験動物とヒトで異なる多くの報告がある [130, 131, 136]。ヒトとラットの肝ミクロソームにおける DIC のグルクロン酸抱合の速度論的解析では、 K_m は同等であったが、 V_{max} は HLM では RLM の 5 倍高く AG の生成に種差が認められる [137]。したがって、ヒトとラットでは、AG の生成と分解の両方に種差がある可能性があるが、 β -glucuronidase および esterase を介した AG 加水分解の種差についての情報は少ない。そこで、第3章では、肝ミクロソームにおける AG 加水分解特性のヒトとラットとの種差について検討した。

Tris-HCl 緩衝液、HLM および RLM における AG 加水分解の経時変化から、検討したすべての AG は、RLM で緩衝液に比べて顕著に加水分解されることが明らかとなった (Fig. 17)。MEF-AG および ETO-AG は、RLM で HLM よりも著しく加水分解されるが、HLM では緩衝液中と同様にほとんど加水分解されなかった (Figs. 17e and f, Table 13)。したがって、RLM で著しく加水分解される NSAID-AG であっても、HLM の AG 加水分解酵素の基質として認識されないことが示唆された。

AG 加水分解に対する β -glucuronidase および esterase の寄与の種差を検討するために、HLM と RLM における AG 加水分解に対する β -glucuronidase および

esterase 阻害の影響を検討した。その結果, HLM では主に esterase が AG 加水分解酵素として機能することが示唆された (Fig. 18)。一方, RLM では, MEF-AG と ETO-AG が β -glucuronidase によってのみ加水分解される以外は, esterase と β -glucuronidase の両方が AG 加水分解に同等に寄与することが確認された (Fig. 19)。これらの結果は, HLM では RLM に比べて β -glucuronidase の AG 加水分解への寄与がはるかに小さいことを示している。これまでの研究で, RLM は HLM に比べ3倍高い β -glucuronidase 活性を持つことが示唆されている [138, 139]。また, HLM 中における mycophenolic acid-AG の加水分解に D-SL は影響を与えないが, PMSF は顕著に阻害する [115]。さらに, HLM 中におけるいくつかの化合物のグルクロン酸抱合活性に D-SL は影響を与えない [140]。これらの報告から, β -glucuronidase は HLM 中の AG 加水分解にほとんど寄与していないことが示唆され, 本研究結果と一致する。AG 加水分解における酵素の寄与の違いが, ヒトとラットの AG 加水分解における種差の原因である可能性がある。

Esterase は, HLM および RLM 中のアリール酢酸 (フェニル酢酸やピロール酢酸など) の AG に分類される TOL-AG, ZOM-AG, LUM-AG および DIC-AG を加水分解したが (Figs. 18 and 19a-d), RLM 中の MEF-AG および ETO-AG を加水分解しなかった (Figs. 19e and f)。これらの結果より, 肝ミクロソームにおいて AG 加水分解酵素として機能する esterase は, 基質認識に対して高い選択性を持つ可能性がある。Table 14 に示すように, MEF-AG と ETO-AG はアリール酢酸の AG よりも緩衝液中ではるかに長い半減期を示す [98, 141]。安息香酸骨格の AG である MEF-AG は α 炭素原子上にベンゼン環を有し, ETO-AG は β 炭素原子上に嵩高い置換基を有している (Fig. 16)。このような置換基の立体障害やグルクロン酸と結

合した炭素原子周りの嵩高さは、AG の化学的安定性に大きな影響を与える [98, 119]。したがって、肝ミクロソームで AG 加水分解酵素として機能する esterase による基質認識にも、立体的な効果が影響していると考えられる。

肝ミクロソーム画分には、多くの esterase が存在する。本研究で用いた esterase 阻害薬 PMSF は、少なくとも carboxyl esterase (CES) 1, CES 2, butyrylcholinesterase, ABHD10 に対して強力な阻害を示す [115]。また、CES1 や CES2 などの esterase は一部の AG を加水分解できないとの報告もある [142]。これまでの研究で、APEH や ABHD10 が特定の AG に対する AG 加水分解酵素として機能することが示唆されているが [114, 115], APEH は PMSF で阻害されない [143]。また、butyrylcholinesterase の AG 加水分解への寄与については情報がない。したがって、ABHD10 は今回検討した NSAID-AG の肝ミクロソーム加水分解に重要な役割を担っている可能性がある。特に HLM において AG は esterase 依存的に加水分解されることから、ABHD10 の AG 加水分解酵素としての詳細な特性解明が必要である。ABHD10 は HLM とヒト肝サイトゾルの両方に存在することから [115], ミクロソーム以外の細胞内分画での AG 加水分解をさらに検討する必要がある。また、組織への AG 蓄積を制御する要因のひとつとして AG 加水分解酵素の重要性を明らかにし、IDT リスクとの関連性についてもさらなる研究が必要である。

以上、第 3 章では、HLM 中 esterase が AG 加水分解に優位に寄与しているが、RLM では esterase と β -glucuronidase の両方が AG 加水分解酵素として機能していることを明らかにした。AG 加水分解酵素として機能する esterase は、基質認識に対して高い選択性を持つ可能性がある。Esterase による基質認識には、AG の

親薬物の化学構造による立体的な効果が影響していると考えられる。このことより、HLM 中における AG 加水分解速度は、緩衝液中での半減期の短い薬物ほど速くなる傾向があり、これは化学的に不安定でカルボニル基周辺の立体障害が小さい化学構造を有する化合物の AG が、esterase により加水分解されやすいためと考えられる。

Table 14. Half-lives of AGs in inorganic buffer

Compound	Chemical structure	Half-life in pH 7.4 (h)
TOL-AG	Pyrrole-acetic acid	0.4 ^a
ZOM-AG	Pyrrole-acetic acid	0.5 ^a
LUM-AG	Phenylacetic acid	1.5 ^b
DIC-AG	Phenylacetic acid	0.7 ^a
MEF-AG	Benzonic acid	>15.0 ^a
ETO-AG	Pyranoacetic acid	>15.0 ^a

a Iwamura et al. (2015).

b Jiao et al. (2020).

総括

本論文は、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs)の慢性炎症時における体内動態変動およびアシルグルクロン酸抱合体 (AG)の加水分解特性を評価することにより、特異体質毒性 (IDT)リスク予測に活用することを目的とした。NSAIDs による IDT 発症には主として肝代謝により生成される NSAID-AGs が原因のひとつと考えられている。IDT は用量非依存的で、薬物自体の要因 (e.g. 化学構造, 投与量, 体内動態)に加え、患者の体質や遺伝的要因 (e.g. 薬物代謝酵素, 受容体, トランスポーター)および環境的要因 (e.g. 食事, 喫煙, 疾患)により発症する。そのため、少数の健常者や患者を対象とした臨床試験段階での IDT 発症予測が非常に困難であり、上市後に初めて発症するケースが多い。また、すでに上市されている医薬品についても IDT リスクが添付文書に記載されている場合があり、IDT リスクの予測や回避方法の確立は新薬開発、臨床の双方において重要な課題である。これまでに AG の化学的不安定さが、タンパク共有結合体形成のされやすさや IDT リスクと相関することが報告されているが [19, 21], AG の化学的不安定さだけでは特異体質性に毒性が惹起される理由が説明できない。そこで本検討では生体内における 1) 薬物のキラル変換反応, 2) AG の酵素による加水分解反応により、薬物により特異体質性に毒性が惹起される理由を説明することを試みた。

NSAIDs のうち、IBU などの 2-アシルプロピオン酸系抗炎症薬 (2-APA)は臨床ではほとんどがラセミ体として使用されているが、薬理作用は主に *S*-体に寄因し、*R*-体には薬効がほとんど認められない [33]。2-APA の体内動態は生体内でキ

ラル変換が起こることが特徴的だが [35-37], *R*-体および *S*-体の親薬物からの AG の生成や, 生成した AG のジアステレオマー間ではタンパク質との共有結合体の形成に差異がある。したがって, 病態時におけるキラル変換により *R*-体と *S*-体の存在比が変動した場合, 2-APA の薬効および毒性発現に大きく影響すると考えられるが, 慢性炎症時における 2-APA のキラル変換に与える影響はこれまでに検討されていない。また, 生体内で AG は, β -glucuronidase や esterase の一種である a/b hydrolase domain containing 10 (ABHD10) や acylpeptide hydrolase (APEH) により組織中で加水分解されること, さらにマウスでは esterase 阻害条件下で zomepirac-AG の腎蓄積量が顕著に増加し, 腎障害が惹起されることが知られており, 加水分解酵素による AG の分解は組織における AG の消失に重要な役割を果たしている可能性がある。特に, 肝臓や腎臓における β -glucuronidase の発現量は個体差が大きいため [28, 29], 加水分解酵素による分解されやすさは IDT との関係が疑われるが, AG 加水分解特性と IDT との関係性はいまだに不明である。

第 1 章では, IBU の体内動態ならびに薬効や毒性発現に大きく影響するキラル変換に対する慢性炎症の影響を明らかにすることを目的とし, 慢性炎症の動物モデルであるアジュバンド関節炎 (AA) ラットに *rac*-IBU, *R*-IBU, *S*-IBU を静脈内投与し, *R*-IBU と *S*-IBU の薬物動態に及ぼす慢性炎症の影響を検討した。AA ラットでは, コントロールラットと比較してキラル変換率 (F_i) は変化しなかった。また, エナンチオマーを問わず AA ラットでは, 血漿中アルブミン量の減少による IBU の血漿中非結合型分率 (f_u) の上昇に伴う全身クリアランス (CL_{tot}) の上昇により, IBU 静脈内投与後の血漿中濃度が低下した。したがって, AA ラットでは IBU の薬効や毒性発現が変化する可能性がある。AA ラットはコントロール

ラットに比べ IBU のグルクロン酸抱合活性が約半分に減少していたが、肝臓内で生成した IBU-AG の胆汁排泄に関わる multidrug resistance protein 2 (MRP2) は AA ラットで発現量が有意に低下することが報告されており [144, 145], 生成した IBU-AG が肝臓内に蓄積する可能性がある。また、第 2 章、第 3 章で着目した β -glucuronidase や esterase による AG 加水分解活性に対する AA の影響については不明である。したがって、AG の肝臓組織への蓄積量および毒性発現に対する AA の影響についてはさらなる検討が必要である。

つぎに、生体内からの AG の消失に関わる AG 加水分解に着目し、第 2 章では、IDT リスクの異なる種々の NSAIDs を用いて、ラット肝ミクロソームにおける NSAID-AGs の生成、酵素による加水分解、化学的不安定性を評価し、IDT リスクとの関連性を検討することを目的とした。肝ミクロソーム中で AG を生成させ、生成した AG の酵素分解性および化学的不安定性を同時に評価することができることから、本方法は AG を調製することなく AG の分解を評価可能である。本検討では、NSAIDs を IDT リスクにより市場撤退 (Withdrawn, WDN) 群、警告 (Warning, WA) 群、および安全 (Safe, SA) 群に分類し、AG の生成および非酵素的分解速度定数には、WDN 群、WA 群および SA 群で顕著な差はなく、WDN 群の酵素的分解速度定数が WA 群および SA 群より大きいことを明らかにした。したがって、IDT リスクの高い薬物の AG は、ラット肝ミクロソーム中で β -glucuronidase や esterase により加水分解されやすいことが示唆された。

さらに、第 3 章では、IDT リスクが高い薬物の AG ほどラット肝ミクロソーム中で加水分解されやすいことが明らかとなったため、ヒトおよびラット肝ミク

ロソーム (HLM および RLM)の AG 加水分解における種差を明らかにすることを目的とした。HLM 中では esterase が AG 加水分解に優位に寄与しているが、RLM 中では esterase と β -glucuronidase の両方が AG 加水分解酵素として機能していることが明らかになった。特に MEF-AG および ETO-AG は、RLM 中で β -glucuronidase によって加水分解され、HLM 中では加水分解されなかったことから、肝ミクロソーム中の esterase は、AG の基質としての認識に対して高い選択性を持つ可能性があり、化学構造中の官能基による立体障害が影響していると考えられた。HLM 中における AG 加水分解速度は、化学的に不安定でカルボニル基周辺の立体障害が小さい化学構造の AG ほど大きくなると考えられる。

以上より、1) ラセミ体の薬物のキラル変換は慢性炎症により影響を受けないため、IDT リスクの要因になる可能性は少ないこと、2) 肝ミクロソームにおける AG の酵素的加水分解の程度は、カルボキシ基を有する酸性薬物の IDT リスク要因となり得ることが示唆された (Fig. 20)。 β -glucuronidase や esterase により加水分解されやすい薬剤候補は、これらの酵素の個人差により、AG が生体内に蓄積することにより IDT を惹起する可能性がある。したがって、AG の生成、酵素的加水分解、非酵素的分解の速度定数を算出・評価することは、薬剤候補の IDT リスクを評価する上で有用であると考えられた。また、AG は HLM 中では主に esterase によって加水分解されることが示唆されたため、ABHD10 や APEH などの AG 加水分解に関わる esterase の個人差の解明が望まれる。APEH がカルバペネム系の抗菌薬によって阻害されることや [26]、遺伝子多型によって IDT を引き起こすことが報告されている [146]。したがって、esterase の活性が低下した際に IDT が惹起される可能性がある。さらに、慢性炎症時などの病態時において

は、肝臓の代謝酵素の活性が低下するため、AG 加水分解酵素活性が変動した場合には、IDT リスクが上昇する要因になる可能性が考えられる。

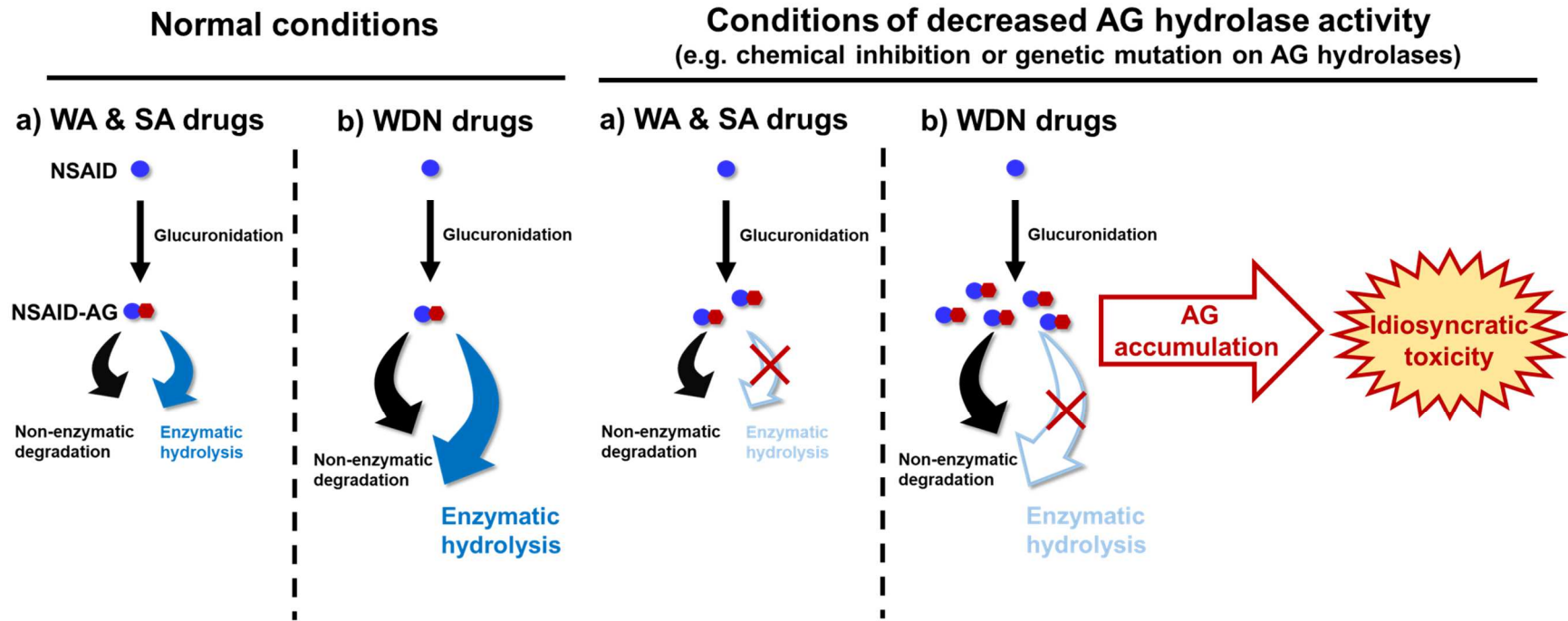


Fig 20. Relationship between the degree of enzymatic and non-enzymatic hydrolysis and IDT risk in normal or decreased AG hydrolase activity conditions.

Classification of NSAIDs with IDT risk. WDN, withdrawn; WA, warning; SA, safe

引用文献

- [1] Harrison RK: Phase II and phase III failures: 2013-2015. *Nat Rev Drug Discov*, **15**, 817-818 (2016).
- [2] Kaplowitz N: Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov*, **4**, 489-499 (2005).
- [3] Björnsson E, Olsson R: Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology*, **42**, 481-489 (2005).
- [4] Chalasani NP, Hayashi PH, Bonkovsky HL, Navarro VJ, Lee WM, Fontana RJ: ACG Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Am. J. Gastroenterol.*, **109**, 950-966; quiz 967 (2014).
- [5] Lee WM: Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity-Isn't it time for APAP to go away? *J. Hepatol.*, **67**, 1324-1331 (2017).
- [6] Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, Ball SE: Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 1201-1208 (2004).
- [7] Gonzalez FJ: The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.*, **40**, 243-288 (1988).
- [8] Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Bélanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW: The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, **7**, 255-269 (1997).
- [9] Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, Nebert DW: Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet. Genomics*, **15**, 677-685 (2005).

- [10] Yokota H, Inoue H, Taniyama H, Kobayashi T, Iwano H, Kagawa Y, Okada H, Yuasa A: High induction of phenol UDP-glucuronosyltransferase in the kidney medulla of beta-naphthoflavone-treated rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **1336**, 165-170 (1997).
- [11] Suleman FG, Abid A, Gradinaru D, Daval JL, Magdalou J, Minn A: Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **358**, 63-67 (1998).
- [12] FDA: Safety Testing of Drug Metabolites Guidance for Industry. (2020).
- [13] Tafazoli S, Spehar DD, O'Brien PJ: Oxidative stress mediated idiosyncratic drug toxicity. *Drug Metab. Rev.*, **37**, 311-325 (2005).
- [14] Krause MM, Brand MD, Krauss S, Meisel C, Vergin H, Burmester GR, Buttgerit F: Nonsteroidal antiinflammatory drugs and a selective cyclooxygenase 2 inhibitor uncouple mitochondria in intact cells. *Arthritis Rheum.*, **48**, 1438-1444 (2003).
- [15] Iwamura A, Nakajima M, Oda S, Yokoi T: Toxicological potential of acyl glucuronides and its assessment. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **32**, 2-11 (2017).
- [16] PMDA. 重篤疾患別対応マニュアル, 薬物性肝障害. (2019).
- [17] Lasser KE, Allen PD, Woolhandler SJ, Himmelstein DU, Wolfe SM, Bor DH: Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications. *JAMA*, **287**, 2215-2220 (2002).
- [18] Ding A, Ojingwa JC, McDonagh AF, Burlingame AL, Benet LZ: Evidence for covalent binding of acyl glucuronides to serum albumin via an imine mechanism as revealed by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 3797-3801 (1993).
- [19] Sawamura R, Okudaira N, Watanabe K, Murai T, Kobayashi Y, Tachibana M, Ohnuki T, Masuda K, Honma H, Kurihara A, Okazaki O: Predictability of idiosyncratic drug toxicity risk for carboxylic acid-containing drugs based on the chemical stability of acyl glucuronide. *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 1857-1864 (2010).

- [20] Chen M, Borlak J, Tong W: High lipophilicity and high daily dose of oral medications are associated with significant risk for drug-induced liver injury. *Hepatology*, **58**, 388-396 (2013).
- [21] Benet LZ, Spahn-Langguth H, Iwakawa S, Volland C, Mizuma T, Mayer S, Mutschler E, Lin ET: Predictability of the covalent binding of acidic drugs in man. *Life Sci.*, **53**, PL141-146 (1993).
- [22] Bischer A, Iwaki M, Zia-Amirhosseini P, Benet LZ: Stereoselective reversible binding properties of the glucuronide conjugates of fenoprofen enantiomers to human serum albumin. *Drug metabolism and disposition*, **23**, 900-903 (1995).
- [23] Shimada H, Kobayashi Y, Tanahashi S, Kawase A, Ogiso T, Iwaki M: Correlation between glucuronidation and covalent adducts formation with proteins of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **112**, 132-138 (2018).
- [24] Kawase A, Hashimoto R, Shibata M, Shimada H, Iwaki M: Involvement of reactive metabolites of diclofenac in cytotoxicity in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Int. J. Toxicol.*, **36**, 260-267 (2017).
- [25] Fukami T: 医薬品による毒性発現に係わるオーファン加水分解酵素の機能解明. *Yakugaku Zasshi*, **135**, (2015).
- [26] Suzuki E, Koyama K, Nakai D, Goda R, Kuga H, Chiba K: Observation of clinically relevant drug interaction in chimeric mice with humanized livers: The case of valproic acid and carbapenem antibiotics. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **42**, 965-972 (2017).
- [27] Iwamura A, Watanabe K, Akai S, Nishinosono T, Tsuneyama K, Oda S, Kume T, Yokoi T: Zomepirac acyl glucuronide is responsible for zomepirac-induced acute kidney injury in mice. *Drug Metab. Dispos.*, **44**, 888-896 (2016).
- [28] Corrales-hernández JJ, González-buitrago JM, Pastor-encinas I, Garcia-diez LC, Miralles JM: Androgen environment and β -Glucuronidase activity in the human kidney. *Arch. Androl.*, **20**, 185-191 (1988).
- [29] Oda S, Fukami T, Yokoi T, Nakajima M: A comprehensive review of UDP-glucuronosyltransferase and esterases for drug development. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **30**, 30-51 (2015).

- [30] Gaut ZN, Baruth H, Randall LO, Ashley C, Paulsrud JR: Stereoisomeric relationships among anti-inflammatory activity, inhibition of platelet aggregation, and inhibition of prostaglandin synthetase. *Prostaglandins*, **10**, 59-66 (1975).
- [31] Adams SS, Bresloff P, Mason CG: Pharmacological differences between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the (-)-isomer. *J. Pharm. Pharmacol.*, **28**, 256-257 (1976).
- [32] Menzel S, Beck WS, Brune K, Geisslinger G: Stereoselectivity of biliary excretion of 2-arylpropionates in rats. *Chirality*, **5**, 422-427 (1993).
- [33] Brune K, Geisslinger G, Menzel-Soglowek S: Pure enantiomers of 2-arylpropionic acids: tools in pain research and improved drugs in rheumatology. *J. Clin. Pharmacol.*, **32**, 944-952 (1992).
- [34] Petrie B, Camacho-Muñoz D: Analysis, fate and toxicity of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters and the environment: a review. *Environ. Chem. Lett.*, **19**, 43-75 (2021).
- [35] Yamaguchi T, Nakamura Y: Stereoselective metabolism of 2-phenylpropionic acid in rat. II. Studies on the organs responsible for the optical isomerization of 2-phenylpropionic acid in rat in vivo. *Drug Metab. Dispos.*, **15**, 535-539 (1987).
- [36] Caldwell J, Hutt AJ, Fournel-Gigleux S: The metabolic chiral inversion and dispositional enantioselectivity of the 2-arylpropionic acids and their biological consequences. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 105-114 (1988).
- [37] Shieh WR, Chen CS: Purification and characterization of novel "2-arylpropionyl-CoA epimerases" from rat liver cytosol and mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **268**, 3487-3493 (1993).
- [38] Bopp RJ, Nash JF, Ridolfo AS, Shepard ER: Stereoselective inversion of (R)-(-)-benoxaprofen to the (S)-(+)-enantiomer in humans. *Drug Metab. Dispos.*, **7**, 356-359 (1979).
- [39] Chen CS, Chen T, Shieh WR: Metabolic stereoisomeric inversion of 2-arylpropionic acids. On the mechanism of ibuprofen epimerization in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **1033**, 1-6 (1990).

- [40] Baillie TA, Adams WJ, Kaiser DG, Olanoff LS, Halstead GW, Harpootlian H, Van Giessen GJ: Mechanistic studies of the metabolic chiral inversion of (R)-ibuprofen in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **249**, 517-523 (1989).
- [41] Rudy AC, Knight PM, Brater DC, Hall SD: Stereoselective metabolism of ibuprofen in humans: administration of R-, S- and racemic ibuprofen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**, 1133-1139 (1991).
- [42] Knihinicki RD, Williams KM, Day RO: Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs--1. In vitro studies of ibuprofen and flurbiprofen. *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 4389-4395 (1989).
- [43] Müller S, Mayer JM, Etter JC, Testa B: Metabolic chiral inversion of ibuprofen in isolated rat hepatocytes. *Chirality*, **2**, 74-78 (1990).
- [44] Chen CS, Shieh WR, Lu PH, Harriman S, Chen CY: Metabolic stereoisomeric inversion of ibuprofen in mammals. *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 411-417 (1991).
- [45] Muller N, Payan E, Lopicque F, Bannwarth B, Netter P: Pharmacological aspects of chiral nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **4**, 617-634 (1990).
- [46] Fournel S, Caldwell J: The metabolic chiral inversion of 2-phenylpropionic acid in rat, mouse and rabbit. *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 4153-4159 (1986).
- [47] Tamura S, Kuzuna S, Kawai K, Kishimoto S: Optical isomerization of R(-)-clidanac to the biologically active S(+)-isomer in guinea-pigs. *J. Pharm. Pharmacol.*, **33**, 701-706 (1981).
- [48] Knights KM, Drew R, Meffin PJ: Enantiospecific formation of fenoprofen coenzyme A thioester in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 3539-3542 (1988).
- [49] Reichel C, Brugger R, Bang H, Geisslinger G, Brune K: Molecular cloning and expression of a 2-arylpropionyl-coenzyme a epimerase: A key enzyme in the inversion metabolism of ibuprofen. *Mol. Pharmacol.*, **51**, 576-582 (1997).
- [50] Volland C, Sun H, Dammeyer J, Benet LZ: Stereoselective degradation of the fenoprofen acyl glucuronide enantiomers and irreversible binding to plasma protein. *Drug Metab. Dispos.*, **19**, 1080-1086 (1991).

- [51] Ahn HY, Amidon GL, Smith DE: Stereoselective systemic disposition of ibuprofen enantiomers in the dog. *Pharm. Res.*, **8**, 1186-1190 (1991).
- [52] Davies NM: Clinical pharmacokinetics of flurbiprofen and its enantiomers. *Clin. Pharmacokinet.*, **28**, 100-114 (1995).
- [53] Brocks DR, Jamali F: Etodolac clinical pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.*, **26**, 259-274 (1994).
- [54] Jamali F, Brocks DR: Clinical pharmacokinetics of ketoprofen and its enantiomers. *Clin. Pharmacokinet.*, **19**, 197-217 (1990).
- [55] Abas A, Meffin PJ: Enantioselective disposition of 2-arylpropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs. IV. Ketoprofen disposition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **240**, 637-641 (1987).
- [56] Foster RT, Jamali F, Russell AS, Alballa SR: Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in healthy subjects following single and multiple doses. *J. Pharm. Sci.*, **77**, 70-73 (1988).
- [57] Pedrazzini S, De Angelis M, Muciaccia WZ, Sacchi C, Forgione A: Stereochemical pharmacokinetics of the 2-arylpropionic acid non-steroidal antiinflammatory drug flunoxaprofen in rats and in man. *Arzneimittelforschung*, **38**, 1170-1175 (1988).
- [58] Williams RO, Feldmann M, Maini RN: Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 9784-9788 (1992).
- [59] Walker KA, Barber HE, Hawksworth GM: Mechanism responsible for altered propranolol disposition in adjuvant-induced arthritis in the rat. *Drug Metab. Dispos.*, **14**, 482-486 (1986).
- [60] Piquette-Miller M, Jamali F: Influence of severity of inflammation on the disposition kinetics of propranolol enantiomers in ketoprofen-treated and untreated adjuvant arthritis. *Drug Metab. Dispos.*, **23**, 240-245 (1995).
- [61] Piquette-Miller M, Jamali F: Effect of adjuvant arthritis on the disposition of acebutolol enantiomers in rats. *Agents Actions*, **37**, 290-296 (1992).

- [62] Pollock SH, Matthews HW, D'Souza MJ: Pharmacokinetic analysis of cyclosporine in adjuvant arthritic rats. *Drug Metab. Dispos.*, **17**, 595-599 (1989).
- [63] Bishop H, Schneider RE, Welling PG: Plasma propranolol concentrations in rats with adjuvant-induced arthritis. *Biopharm. Drug Dispos.*, **2**, 291-297 (1981).
- [64] Toda A, Ishii N, Kihara T, Nagamatsu A, Shimeno H: Effect of adjuvant-induced arthritis on hepatic drug metabolism in rats. *Xenobiotica*, **24**, 603-611 (1994).
- [65] Meunier CJ, Verbeeck RK: Glucuronidation of R- and S-ketoprofen, acetaminophen, and diflunisal by liver microsomes of adjuvant-induced arthritic rats. *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 26-31 (1999).
- [66] Meunier CJ, Verbeeck RK: Glucuronidation kinetics of R,S-ketoprofen in adjuvant-induced arthritic rats. *Pharm. Res.*, **16**, 1081-1086 (1999).
- [67] 久保 道, 森浦 俊, 松田 秀: 漢薬・炮附子の薬理活性研究(第1報)アジュバント関節炎に及ぼす炮附子水抽出エキスの影響. *薬学雑誌*, **110**, 16-26 (1990).
- [68] Upton RA: Simple and reliable method for serial sampling of blood from rats. *J. Pharm. Sci.*, **64**, 112-114 (1975).
- [69] Dietzel K, Beck WS, Schneider HT, Geisslinger G, Brune K: The biliary elimination and enterohepatic circulation of ibuprofen in rats. *Pharm. Res.*, **7**, 87-90 (1990).
- [70] Omura T, Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378 (1964).
- [71] Wright MR, Sattari S, Brocks DR, Jamali F: Improved high-performance liquid chromatographic assay method for the enantiomers of ibuprofen. *J. Chromatogr.*, **583**, 259-265 (1992).
- [72] Andrew J. McLachlan KMW: Estimation of the rate and extent of chiral inversion using linear systems analysis. *Chirality*, **7**, 632-635 (1995).
- [73] Karol MD, Goodrich S: Metabolite formation pharmacokinetics: rate and extent of metabolite formation determined by deconvolution. *Pharm. Res.*, **5**, 347-351 (1988).

- [74] Nagao T, Tanino T, Iwaki M: Stereoselective pharmacokinetics of flurbiprofen and formation of covalent adducts with plasma protein in adjuvant-induced arthritic rats. *Chirality*, **15**, 423-428 (2003).
- [75] Kawase A, Ikuta H, Uno S, Yamamoto K, Akitsu N, Nagao T, Iwaki M: Alteration in plasma protein binding properties of propranolol and flurbiprofen during development of adjuvant-induced arthritis in rats. *Xenobiotica*, **43**, 246-252 (2013).
- [76] Davies NM: Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. *Clin. Pharmacokinet.*, **34**, 101-154 (1998).
- [77] Evans AM, Nation RL, Sansom LN, Bochner F, Somogyi AA: The relationship between the pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers and the dose of racemic ibuprofen in humans. *Biopharm. Drug Dispos.*, **11**, 507-518 (1990).
- [78] Tan SC, Patel BK, Jackson SH, Swift CG, Hutt AJ: Stereoselectivity of ibuprofen metabolism and pharmacokinetics following the administration of the racemate to healthy volunteers. *Xenobiotica*, **32**, 683-697 (2002).
- [79] Mills RF, Adams SS, Cliffe EE, Dickinson W, Nicholson JS: The metabolism of ibuprofen. *Xenobiotica*, **3**, 589-598 (1973).
- [80] Hamman MA, Thompson GA, Hall SD: Regioselective and stereoselective metabolism of ibuprofen by human cytochrome P450 2C. *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 33-41 (1997).
- [81] Buchheit D, Drăgan C-A, Schmitt EI, Bureik M: Production of ibuprofen acyl glucosides by human UGT2B7. *Drug Metabolism and Disposition*, **39**, 2174-2181 (2011).
- [82] Borgå O, Borgå B: Serum protein binding of nonsteroidal antiinflammatory drugs: a comparative study. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **25**, 63-77 (1997).
- [83] Itoh T, Maruyama J, Tsuda Y, Yamada H: Stereoselective pharmacokinetics of ibuprofen in rats: effect of enantiomer-enantiomer interaction in plasma protein binding. *Chirality*, **9**, 354-361 (1997).
- [84] Rubin A, Knadler MP, Ho PP, Bechtol LD, Wolen RL: Stereoselective inversion of (R)-fenoprofen to (S)-fenoprofen in humans. *J. Pharm. Sci.*, **74**, 82-84 (1985).

- [85] Chang S-Y, Li W, Traeger SC, Wang B, Cui D, Zhang H, Wen B, Rodrigues AD: Confirmation that cytochrome P450 2C8 (CYP2C8) plays a minor role in (S)-(+)- and (R)-(-)-ibuprofen hydroxylation in vitro. *Drug Metabolism and Disposition*, **36**, 2513-2522 (2008).
- [86] Rudy AC, Knight PM, Brater DC, Hall SD: Stereoselective metabolism of ibuprofen in humans: administration of R-, S- and racemic ibuprofen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**, 1133-1139 (1991).
- [87] el Mouelhi M, Ruelius HW, Fenselau C, Dulik DM: Species-dependent enantioselective glucuronidation of three 2-arylpropionic acids. Naproxen, ibuprofen, and benoxaprofen. *Drug Metab. Dispos.*, **15**, 767-772 (1987).
- [88] Knihinicki RD, Day RO, Williams KM: Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs--II. Racemization and hydrolysis of (R)- and (S)-ibuprofen-CoA thioesters. *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 1905-1911 (1991).
- [89] Lee EJ, Williams KM, Graham GG, Day RO, Champion GD: Liquid chromatographic determination and plasma concentration profile of optical isomers of ibuprofen in humans. *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1542-1544 (1984).
- [90] Menzel S, Waibel R, Brune K, Geisslinger G: Is the formation of R-ibuprofenyl-adenylate the first stereoselective step of chiral inversion? *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 1056-1058 (1994).
- [91] Knadler MP, Hall SD: Stereoselective arylpropionyl-CoA thioester formation in vitro. *Chirality*, **2**, 67-73 (1990).
- [92] Knights KM, Addinall TF, Roberts BJ: Enhanced chiral inversion of R-ibuprofen in liver from rats treated with clofibrilic acid. *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 1775-1777 (1991).
- [93] Tracy TS, Hall SD: Metabolic inversion of (R)-ibuprofen. Epimerization and hydrolysis of ibuprofenyl-coenzyme A. *Drug Metab. Dispos.*, **20**, 322-327 (1992).
- [94] Williams AM, Worrall S, de Jersey J, Dickinson RG: Studies on the reactivity of acyl glucuronides--III. Glucuronide-derived adducts of valproic acid and plasma protein and anti-adduct antibodies in humans. *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 745-755 (1992).

- [95] Ikeda T: Recent findings regarding the mechanism of idiosyncratic drug toxicity. *Yakugaku Zasshi*, **135**, 567-578 (2015).
- [96] Zhou S, Chan E, Duan W, Huang M, Chen YZ: Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug Metab. Rev.*, **37**, 41-213 (2005).
- [97] Iwaki M, Ogiso T, Inagawa S, Kakehi K: In vitro regioselective stability of beta-1-O- and 2-O-acyl glucuronides of naproxen and their covalent binding to human serum albumin. *J. Pharm. Sci.*, **88**, 52-57 (1999).
- [98] Iwamura A, Ito M, Mitsui H, Hasegawa J, Kosaka K, Kino I, Tsuda M, Nakajima M, Yokoi T, Kume T: Toxicological evaluation of acyl glucuronides utilizing half-lives, peptide adducts, and immunostimulation assays. *Toxicol. In Vitro*, **30**, 241-249 (2015).
- [99] Lassila T, Hokkanen J, Aatsinki SM, Mattila S, Turpeinen M, Tolonen A: Toxicity of carboxylic acid-containing drugs: The role of acyl migration and CoA conjugation investigated. *Chem. Res. Toxicol.*, **28**, 2292-2303 (2015).
- [100] Rachmel A, Hazelton GA, Yergey AL, Liberato DJ: Furosemide 1-O-acyl glucuronide. In vitro biosynthesis and pH-dependent isomerization to beta-glucuronidase-resistant forms. *Drug Metab. Dispos.*, **13**, 705-710 (1985).
- [101] Dubois-Presle N, Lopicque F, Maurice MH, Fournel-Gigleux S, Magdalou J, Abiteboul M, Siest G, Netter P: Stereoselective esterase activity of human serum albumin toward ketoprofen glucuronide. *Mol. Pharmacol.*, **47**, 647-653 (1995).
- [102] Smith PC, McDONAGH AF, Benet LZ: Effect of esterase inhibition on the disposition of zomepirac glucuronide and its covalent binding to plasma proteins in the guinea pig. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **252**, 218-224 (1990).
- [103] Oda S, Matsuo K, Nakajima A, Yokoi T: A novel cell-based assay for the evaluation of immune- and inflammatory-related gene expression as biomarkers for the risk assessment of drug-induced liver injury. *Toxicol. Lett.*, **241**, 60-70 (2016).
- [104] Xu J, Oda S, Yokoi T: Cell-based assay using glutathione-depleted HepaRG and HepG2 human liver cells for predicting drug-induced liver injury. *Toxicol. In Vitro*, **48**, 286-301 (2018).

- [105] Oda S, Uchida Y, Aleo MD, Koza-Taylor PH, Matsui Y, Hizue M, Marroquin LD, Whritenour J, Uchida E, Yokoi T: An in vitro coculture system of human peripheral blood mononuclear cells with hepatocellular carcinoma-derived cells for predicting drug-induced liver injury. *Arch. Toxicol.*, **95**, 149-168 (2021).
- [106] Nakayama S, Atsumi R, Takakusa H, Kobayashi Y, Kurihara A, Nagai Y, Nakai D, Okazaki O: A zone classification system for risk assessment of idiosyncratic drug toxicity using daily dose and covalent binding. *Drug Metabolism and Disposition*, **37**, 1970-1977 (2009).
- [107] Usui T, Mise M, Hashizume T, Yabuki M, Komuro S: Evaluation of the potential for drug-induced liver injury based on in vitro covalent binding to human liver proteins. *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 2383-2392 (2009).
- [108] Mizoi K, Arakawa H, Yano K, Koyama S, Kojima H, Ogihara T: Utility of three-dimensional cultures of primary human hepatocytes (spheroids) as pharmacokinetic models. *Biomedicines*, **8**, (2020).
- [109] Khetani SR, Kanchagar C, Ukairo O, Krzyzewski S, Moore A, Shi J, Aoyama S, Aleo M, Will Y: Use of micropatterned cocultures to detect compounds that cause drug-induced liver injury in humans. *Toxicol. Sci.*, **132**, 107-117 (2013).
- [110] Kuehl GE, Lampe JW, Potter JD, Bigler J: Glucuronidation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: identifying the enzymes responsible in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 1027-1035 (2005).
- [111] Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T: A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *J. Pharmacobiodyn.*, **4**, 879-885 (1981).
- [112] Uraki M, Kawase A, Iwaki M: Stereoselective hepatic disposition of ibuprofen in the perfused liver of rat with adjuvant-induced arthritis. *Xenobiotica*, **47**, 943-950 (2017).
- [113] Sperker B, Backman JT, Kroemer HK: The role of beta-glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans. *Clin. Pharmacokinet.*, **33**, 18-31 (1997).
- [114] Ito Y, Fukami T, Yokoi T, Nakajima M: An orphan esterase ABHD10 modulates probenecid acyl glucuronidation in human liver. *Drug Metab. Dispos.*, **42**, 2109-2116 (2014).

- [115] Iwamura A, Fukami T, Higuchi R, Nakajima M, Yokoi T: Human alpha/beta hydrolase domain containing 10 (ABHD10) is responsible enzyme for deglucuronidation of mycophenolic acid acyl-glucuronide in liver. *J. Biol. Chem.*, **287**, 9240-9249 (2012).
- [116] Castillo M, Smith PC: Disposition and reactivity of ibuprofen and ibufenac acyl glucuronides in vivo in the rhesus monkey and in vitro with human serum albumin. *Drug Metab. Dispos.*, **23**, 566-572 (1995).
- [117] Hyneck ML, Munafo A, Benet LZ: Effect of pH on acyl migration and hydrolysis of tolmetin glucuronide. *Drug Metab. Dispos.*, **16**, 322-324 (1988).
- [118] Jino N, Ohashi S, Tagashira M, Kohira T, Yamada S: A simple method to evaluate reactivity of acylglucuronides optimized for early stage drug discovery. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 1509-1513 (2013).
- [119] Camilleri P, Buch A, Soldo B, Hutt AJ: The influence of physicochemical properties on the reactivity and stability of acyl glucuronides (dagger). *Xenobiotica*, **48**, 958-972 (2018).
- [120] Tugcu G, Sipahi H: QSPR modelling of in vitro degradation half-life of acyl glucuronides. *Xenobiotica*, **49**, 1007-1014 (2019).
- [121] Vanderhoeven SJ, Troke J, Tranter GE, Wilson ID, Nicholson JK, Lindon JC: Nuclear magnetic resonance (NMR) and quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies on the transacylation reactivity of model 1beta-O-acyl glucuronides. II: QSAR modelling of the reaction using both computational and experimental NMR parameters. *Xenobiotica*, **34**, 889-900 (2004).
- [122] Baba A, Yoshioka T: Structure-activity relationships for degradation reaction of 1-beta-o-acyl glucuronides: kinetic description and prediction of intrinsic electrophilic reactivity under physiological conditions. *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 158-172 (2009).
- [123] Iddon L, Richards SE, Johnson CH, Harding JR, Wilson ID, Nicholson JK, Lindon JC, Stachulski AV: Synthesis of a series of phenylacetic acid 1- β -O-acyl glucosides and comparison of their acyl migration and hydrolysis kinetics with the corresponding acyl glucuronides. *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 926-934 (2011).

- [124] Yoshioka T, Baba A: Structure-activity relationships for the degradation reaction of 1-beta-O-acyl glucuronides. Part 2: Electronic and steric descriptors predicting the reactivity of 1-beta-O-acyl glucuronides derived from benzoic acids. *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 1559-1569 (2009).
- [125] Smith PC, Benet LZ, McDonagh AF: Covalent binding of zomepirac glucuronide to proteins: evidence for a Schiff base mechanism. *Drug Metab. Dispos.*, **18**, 639-644 (1990).
- [126] Spahn-Langguth H, Benet LZ: Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? *Drug Metab. Rev.*, **24**, 5-47 (1992).
- [127] Tanaka Y, Suzuki A: Enzymatic hydrolysis of zenarestat 1-O-acylglucuronide. *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 235-239 (1994).
- [128] Brunelle FM, Verbeeck RK: Conjugation-deconjugation cycling of diflunisal via beta-glucuronidase catalyzed hydrolysis of its acyl glucuronide in the rat. *Life Sci.*, **60**, 2013-2021 (1997).
- [129] Suzuki E, Yamamura N, Ogura Y, Nakai D, Kubota K, Kobayashi N, Miura S, Okazaki O: Identification of valproic acid glucuronide hydrolase as a key enzyme for the interaction of valproic acid with carbapenem antibiotics. *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 1538-1544 (2010).
- [130] Soars MG, Riley RJ, Findlay KA, Coffey MJ, Burchell B: Evidence for significant differences in microsomal drug glucuronidation by canine and human liver and kidney. *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 121-126 (2001).
- [131] Shiratani H, Katoh M, Nakajima M, Yokoi T: Species differences in UDP-glucuronosyltransferase activities in mice and rats. *Drug Metabolism and Disposition*, **36**, 1745-1752 (2008).
- [132] Asai Y, Sakakibara Y, Kondo M, Nadai M, Katoh M: Species and tissue differences in β -estradiol 17-glucuronidation. *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 1754-1758 (2017).
- [133] Kojima A, Nadai M, Katoh M: Species and tissue differences in regorafenib glucuronidation. *Xenobiotica*, **52**, 129-133 (2022).

- [134] Miyake Y, Mayumi K, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Narimatsu S, Hanioka N: cDNA cloning and functional analysis of minipig uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 452-461 (2013).
- [135] Higashi E, Ando A, Iwano S, Murayama N, Yamazaki H, Miyamoto Y: Hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase (UGT) activities in the microminipig. *Biopharm. Drug Dispos.*, **35**, 313-320 (2014).
- [136] Miles KK, Stern ST, Smith PC, Kessler FK, Ali S, Ritter JK: An investigation of human and rat liver microsomal mycophenolic acid glucuronidation: evidence for a principal role of UGT1A enzymes and species differences in UGT1A specificity. *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 1513-1520 (2005).
- [137] King C, Tang W, Ngui J, Tephly T, Braun M: Characterization of rat and human UDP-glucuronosyltransferases responsible for the in vitro glucuronidation of diclofenac. *Toxicol. Sci.*, **61**, 49-53 (2001).
- [138] Wong KP: A new fluorometric assay of beta-glucuronidase in tissues and serum. *Anal. Biochem.*, **35**, 35-45 (1970).
- [139] Brunelle FM, Verbeeck RK: Glucuronidation of diflunisal in liver and kidney microsomes of rat and man. *Xenobiotica*, **26**, 123-131 (1996).
- [140] Oleson L, Court MH: Effect of the beta-glucuronidase inhibitor saccharolactone on glucuronidation by human tissue microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferases. *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**, 1175-1182 (2008).
- [141] Jiao W, Zhao X, Wu G, Zhang X, Wu H, Cui Y: Bioactivation of lumiracoxib in human liver microsomes: Formation of GSH- and amino adducts through acyl glucuronide. *Drug Test Anal*, **12**, 827-835 (2020).
- [142] Inoue NR, Hall A, Lai WG, Williams ET: Reversible inhibition of human carboxylesterases by acyl glucuronides. *Drug Metab. Dispos.*, **41**, 698-703 (2013).
- [143] Kobayashi K, Smith JA: Acyl-peptide hydrolase from rat liver. Characterization of enzyme reaction. *J. Biol. Chem.*, **262**, 11435-11445 (1987).
- [144] Seitz S, Kretz-Rommel A, Oude Elferink RP, Boelsterli UA: Selective protein adduct formation of diclofenac glucuronide is critically dependent on the rat

canalicular conjugate export pump (Mrp2). *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 513-519 (1998).

[145] Uno S, Uraki M, Ito A, Shinozaki Y, Yamada A, Kawase A, Iwaki M: Changes in mRNA expression of ABC and SLC transporters in liver and intestines of the adjuvant-induced arthritis rat. *Biopharm. Drug Dispos.*, **30**, 49-54 (2009).

[146] Tsortouktzidis D, Grundke K, Till C, Korwitz-Reichelt A, Sass JO: Acylpeptide hydrolase (APEH) sequence variants with potential impact on the metabolism of the antiepileptic drug valproic acid. *Metab. Brain Dis.*, **34**, 1629-1634 (2019).

略語一覽表

AA	adjuvant-induced arthritis
ABHD10	a/b hydrolase domain containing 10
2-APA	2-arylpropionic acid
ACS	acyl-coenzyme A synthetase
AG	acyl glucuronide
APAP	acetaminophen
APCE	2-aryl propionyl-coenzyme A epimerase
APEH	acylpeptide hydrolase
AUC	area under the drug concentration-time curve
AUMC	area under the first moment curve
BCRP	breast cancer resistance protein
CL_{glu}	glucuronidation clearance
CL_{int}	intrinsic hepatic clearance
CL_{MET}	metabolism clearance
CL_{ox}	oxidation clearance
CL_{RS}	chiral inversion clearance
CL_{tot}	total clearance
COX	cyclooxygenase
CYP450	cytochrome P450
DIC	diclofenac
DILI	drug-induced liver injury
D-SL	D-saccharic acid 1,4-lactone
ETO	etodolac
F_i	fractional chiral inversion
$F_{i\text{AUC}}$	fractional chiral inversion using the AUC comparison
$F_{i\text{DECON}}$	fractional chiral inversion using the deconvolution method
$F_{i\text{COMP}}$	fractional chiral inversion using compartment analysis
f_u	unbound fractions
FDA	U.S. Food and Drug Administration
HLM	human liver microsomes
HPLC	high-performance liquid chromatography
IBF	ibufenac

IBU	ibuprofen
IDT	idiosyncratic drug toxicity
I.S.	internal standard
KET	ketoprofen
K_{RS}	inversion rate constants
LUM	lumiracoxib
MEF	mefenamic acid
MIST	Safety Testing of Drug Metabolites
MRT	mean residence time
NAP	naproxen
NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs
RLM	rat liver microsomes
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
<i>rac</i>	racemic mixtures
SA	safe
SD	Sprague-Dawley
$T_{1/2}$	half-life time
$T_{1/2inv}$	half-life for chiral inversion
TOL	tolmetin
UDPGA	UDP-glucuronic acid
UGT	UDP-glucuronosyltransferase
V_1	central compartment
V_2	peripheral compartment
Vd_{ss}	volume of drug distribution at steady-state
WA	warning
WDN	withdrawn
ZOM	zomepirac

謝辞

本研究に際し，長年にわたり懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました近畿大学薬学部 岩城正宏教授に深く感謝します。

本研究に際し，懇切なるご指導を頂きました近畿大学薬学部 川瀬篤史准教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行ならびに論文作成にあたり，直接ご指導頂き甚大なるご協力と有益なご助言を頂きました近畿大学薬学部 島田紘明講師に深く感謝いたします。

本研究の遂行にご協力いただきました近畿大学薬学部 生物薬剤学研究室 熊澤佳亮学士，塩尻真弓学士，阪本健次郎氏，中村令奈氏を始め生物薬剤学研究室の諸氏に感謝いたします。

最後に，終始多大なる協力のもと，私を心身ともに支えてくれた妻 明子，息子 涼介，娘 菜々美に心から感謝します。