

論文の内容の要旨

論文題目 プロドラッグの体内動態に関する研究
 —トランスポーターの関与—

氏名 奥平典子

脂溶性のプロモイエティを導入することにより消化管粘膜透過性を改善したプロドラッグには、抗生物質、ACE阻害剤などの例がある。プロドラッグ化の成功には、①膜透過性の上昇が吸収率に反映されること、②プロモイエティが生体に作用しないことなどが必要である。本研究では、それぞれの点について、プロドラッグの開発研究で問題となった事例をとりあげメカニズムの解明を行った。

I. 抗血小板薬 GP-IIb/IIIa 拮抗薬は、多くの製薬企業においてカルボキシエステル型プロドラッグが合成されたが、いずれも経口吸収率が改善されなかった。この原因を解明するため、GP-IIb/IIIa 拮抗薬のプロドラッグ ME3229 をモデル化合物として消化管吸収動態を解析した。

II. プロモイエティと Pivaloyloxymethyl(POM)基を持つプロドラッグを、長期間大量に服用した小児において、血中及び筋肉中 carnitine 濃度が低下し、carnitine 欠乏症の症状を呈した例が報告されている。通常の用法、用量で、血漿中濃度は正常時の約 50% に低下するものの、carnitine 代謝に関連する副作用は報告されておらず、臓器中濃度に関する情報は乏しい。そこで血漿中 carnitine 低下時における臓器中 carnitine の動態を解析した。

【結果及び考察】

I. GPIIb/IIIa 拮抗剤のエステル型プロドラッグの消化管吸収動態

I-1. カルボキシエステル型プロドラッグの消化管吸収動態の検討

GP-IIb/IIIa 拮抗薬 ME3277 は、分子内にカルボン酸とアミノ基を有する極性化合物であり、それ自身はほとんど経口吸収されない。ME3277 の 2 つのカルボン酸をブチルエステル化したプロドラッグ ME3229 は、その脂溶性、Caco-2 細胞膜透過性より、良好な経口吸収性が期待されたが、ラットに ^{14}C -ME3229 を経口投与後の尿中及び胆汁中排泄率より求めた吸収率は 10.0% であった。

ラットの消化管一回灌流法により、ME3229 の吸収動態を解析した結果、ME3229 はその脂溶性、膜透過性に応じた速度で消化管粘膜を透過し、消化管細胞内に移行するものの、細胞内で生成した代謝物（モノエステル体及び ME3277 等の diacid 体）の血液側への到達率が低いことが示された。ME3229 を含む溶液で灌流後、薬物を含まない灌流液に切替え、血液側、管腔側への代謝物の出現速度を測定したところ、灌流液を切替え管腔からプロドラッグが消失した後も、引き続き代謝物が出現し、その速度比は 17:1（管腔側：血液側）であった。従って、細胞内で生じた代謝物が主として管腔側へ排出され、血液側への到達率が低かったため、プロドラッグ化が吸収率の上昇につながらなかったものと推定された。

ME3229 の代謝物の消化管組織透過性は、モノエステル体及び ME3277 共に、glucose 存在下では排出方向>吸収方向の方向性が認められた。glucose 非存在下ではその差が縮小したことから、代謝物は、brush border membrane 上に存在する transporter により、エネルギー依存的に管腔側へ排出されるものと考えられた。

消化管粘膜上に存在し、消化管吸収のバリアーとして機能することが示唆されている efflux transporter としては、P-glycoprotein(P-gp), canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance associated protein 2(cMOAT/MRP2)等が報告されている。代謝的に安定な ME3277 を用いて、これら既知の transporter が関与している可能性について検討した。ME3277 の Caco-2 細胞単層膜透過性には方向性が認められず、ラット小腸における透過定数に部位差は認められなかった。P-gp の特異的阻害剤である verapamil による efflux の阻害効果は認められず、cMOAT/MRP2 が遺伝的に欠損した Eisai hyperbilirubinemic rat (EHBR)における efflux の低下も認められなかった。以上の知見より、ME3277 の efflux には、P-gp、cMOAT/MRP2 以外の transporter が関与している可能性が示された。また、ME3277 の efflux は、1-naphtol、CDNB 及び BSP により有意に阻害されたことから、MRP family または OATP family と類似の基質特異性を持つことが示された。

I-2. ダブルプロドラッグの消化管吸収動態の検討

ME3230 は、GP IIb/IIIa 拮抗剤 EF5154 のカルボン酸及びアミノ基をマスクしたダ

ブルプロドラッグであり、ラットにおいて良好な経口吸収率（52.1%）を示した。小腸一回灌流実験及び Ussing chamber 法による吸収動態及び消化管粘膜透過性を検討した結果、プロドラッグ化により膜透過性が上昇した ME3230 は、消化管粘膜を透過して細胞内に移行し、カルボン酸またはアミノ基のプロモイエティが加水分解され、膜透過性の低い代謝物に変換されることが示唆された。これらの代謝物は徐々に管腔側及び血液側に移行するが、ME3229 と比較すると血液側への移行率が高く、このため、ME3230 は、高い経口吸収率を示したものと考えられた。

I-3. プロドラッグ消化管吸収における efflux transporter の関与

プロドラッグが消化管細胞内移行した後、細胞内で生成された代謝物は、細胞内→管腔、細胞内→血液側の両方向に濃度勾配を生じるが、ME3229 のように、代謝物が消化管粘膜上に存在する efflux transporter の基質となり管腔に排出される場合、血液側への移行率が低下し、これがプロドラッグの経口吸収性を決定する重要な要因の一つであることが明らかになった（図1）。

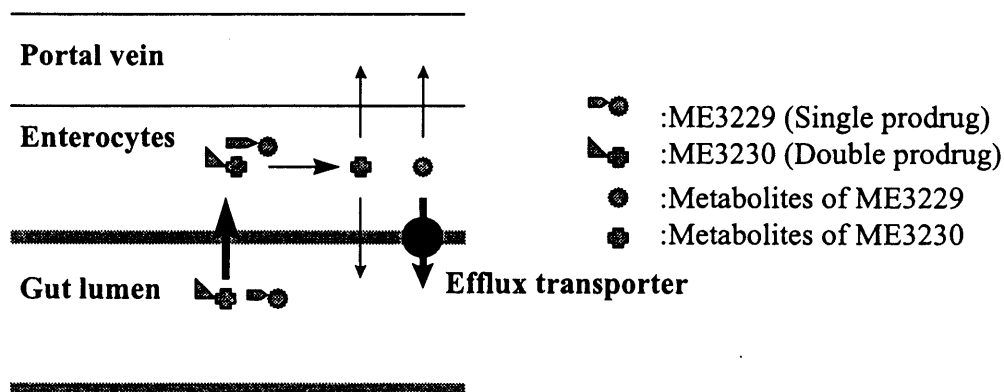


図1. プロドラッグの消化管吸収における efflux transporter の関与

II. プロモイエティ pivaloyloxymethyl(POM)基が内因性 carnitine 動態に及ぼす影響

POM 基をもつプロドラッグは、吸収過程で遊離される pivalic acid (PVA)が、carnitine と抱合し carnitine の排泄を促進することにより、血漿中 carnitine レベルを低下させる。ラットに PVA を反復投与すると、ヒトと同様に carnitine との抱合体 (pivaloylcarnitine)が尿中に排泄され、血漿中 carnitine 濃度(Cp)が低下した。腎臓中の carnitine 濃度は、血漿とほぼ同様の推移を示したが、肝、筋、心臓中の濃度は投与期間中ほとんど低下しなかった。肝臓を除く臓器では carnitine は生合成されず、血液からの取り込みにより濃度を維持しているにも関わらず、血漿中濃度低下時に臓器中濃度が変化しなかった原因を解明するため、無処置ラットと PVA 投与ラットにおける血液から各臓器への取り込み能(CL_{uptake})を *in vivo* で測定した（表1）。腎における CL_{uptake} は、inulin の CL_{uptake} と近い値を示し、PVA により変化しなかった。また、心臓におけ

る CL_{uptake} も PVA 投与により変化しなかった。一方、肝臓、筋肉における CL_{uptake} は、PVA 反復投与により約 2～6 倍に上昇した。

以上の結果より、各臓器における carnitine 濃度推移は、以下のように説明された。

腎：主に糸球体ろ過された carnitine を腎尿細管から再吸収することにより濃度を維持しており、PVA 投与により糸球体ろ過速度は変化しないため、腎への取り込み速度が C_p に比例して低下し、turn over が速いため速やかに新たな平衡状態に達した。

肝、筋： CL_{uptake} が上昇したため、 C_p が低下しても臓器への取り込み速度 ($CL_{\text{uptake}} \times C_p$) は低下せず、臓器中濃度が維持された。

心： CL_{uptake} からは臓器中濃度を説明できないが、turn over rate が遅いため濃度変化が緩慢であることが緩やかな濃度推移を示した一因と考えられた。

表 1 無処置ラット及びピバリン酸投与ラットにおける $^3\text{H-L-carnitine}$ の組織取り込みクリアランス

Tissue	Weight (g/250g rat)	CL_{uptake} (mL/min/rat) ¹⁾		Turnover rate (hr) ²⁾
		Control	PVA treated	
Kidney	2	1.26 ± 0.44	1.12 ± 0.28	0.48
Liver	11	0.89 ± 0.19	1.76 ± 0.26	1.4
Heart	1	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0	39
Muscle	125	0.25 ± 0.01	1.5 ± 0.25	76
Kidney ($^{14}\text{C-inulin}$)	2	0.69 ± 0.24	0.88 ± 0.02	-

1) Mean ± calculated S.E. Calculated from the integration plot of $^3\text{H-L-carnitine}$.

2) Amount of carnitine in the tissue / $CL_{\text{uptake}} / 60$

CL_{uptake} 上昇のメカニズムを検討するため、無処置ラット及び PVA 投与ラットより肝細胞を調製し、取りこみ速度定数を測定した結果、PVA 投与により飽和性のある取り込み過程の V_{max} が有意に上昇し、carnitine transporter の up-regulation が示唆された。transporter を介した carnitine 取り込み能の上昇による臓器中濃度の維持は、POM 基を持つプロドラッグを投与した場合の安全性に寄与しているものと考えられた。

【結論】

- ① 吸収率の低いカルボキシエステルタイプのプロドラッグは、消化管細胞内に移行後、細胞内で生じた代謝物が BBM 上の efflux transporter により管腔に排出され、血液側への到達率が低いいため、膜透過性の上昇が経口吸収率の改善につながらなかった。
- ② PVA 投与時の carnitine の動態を定量的に解析した結果、血漿中 carnitine 濃度は必ずしも臓器中濃度の低下を意味せず、各臓器中の carnitine 濃度推移は、carnitine の臓器取り込み能の変化等を考慮することにより説明された。
- ③ プロドラッグ化による効率的な経口剤の開発には、従来の評価項目（膜透過性、活性体への変換率）に加え、消化管細胞内で生成された代謝物の efflux transport、吸収過程で遊離されるプロモイエティの挙動と生体への作用を考慮することが重要である。