

学位論文題名

薬物の光学異性体の体内における

相互変換メカニズムに関する研究

—不斉硫黄原子を含むフロセキナンを例として—

学位論文内容の要旨

薬物が生体内に投与され、受容体等を介した薬理反応、また薬物の特定の官能基を認識して進む薬物代謝などの反応には、すべて光学的特異性が大きく関与している。我々が現在使用している薬物には、その分子内に不斉原子を有し、ラセミ体として使用しているものが多く存在する。最近の分析化学の進歩とともに、薬物の異性体間の体内動態に著しい差があることが見い出されるようになってきた。このような異性体の体内動態の研究は薬物の薬効や毒性の発現にも大きな意味をもつことが認識されるようになってきた。

近年、薬物として開発される化合物の構造は複雑かつ多様になり、炭素原子以外の不斉原子に起因する光学異性体を有する化合物も増加しつつある。硫黄原子もキラリティーが発生する場合があるが、不斉硫黄原子に起因する光学異性体の体内動態に関する研究はほとんど行われていない。そこで、不斉硫黄原子に起因する光学異性体の体内動態について検討した。モデル化合物としてスルフォキシド基を有し、比較的構造が単純なフロセキナンを選択した。フロセキナンの主要な代謝物は不斉硫黄の酸化反応によって生成するスルフォン体(FSO₂)と還元反応によって生成するスルフィド体(FS)のみであり、不斉硫黄原子以外の部位での代謝がほとんど起こらないことから、モデル化合物として適していると考えられる。

光学異性体の体内動態を検討するために、フロセキナンの各異性体の分離定量と代謝物のFSO₂とFSを同時に測定可能なHPLCによる定量法について検討し、キラルな固定相のChiralcel ODカラムを用い、操作が簡便で精度および再現性に優れた定量法を確立した。

本定量法を用いて、ラットにおける光学異性体の体内動態についての検討し、生体内で興味ある挙動を示すことを明らかにした。すなわち、一方の異性体をラットに経口投与すると、血漿中に他方の異性体が検出された。さらに、この相互変換には選択性があり、S-FSOからR-FSOへの変換が優位に起こった。このような光学異性体の体内での相互変換の例は他の薬物でも認められるが、不斉硫黄原子に起因する光学活性な薬物に関する報告はない。そこで、不斉硫黄原子(スルフォキシド基)を有する薬物の光学異性体の生体内相互変換のメカニズムを明らかにすることを目的として研究を進めた。

生体内相互変換の起こるメカニズムとして、光学不活性な代謝物であるFSあるいはFSO₂が、それぞれS-酸化および還元反応によって再度R-FSOとS-FSOに代謝されるためと推察し、

ラットにFSとFSO₂を静脈内投与した。その結果、FSを投与した場合にのみ血漿中にR-FSOとS-FSOが検出されたことから、生体内相互変換はFSを介して生ずることが明らかになった。また、R-FSOとS-FSOを経口投与した場合の生体内での相互変換は静脈内投与した場合に比較して高く、無菌ラットおよび抗生物質で処理したラットでは相互変換が認められなかった。したがって、経口投与されたフロセキナンは主に腸内細菌によって還元され、生成したFSが体内で再びR-FSOとS-FSOにS-酸化されると考えられた。そこで、相互変換の機序とその選択性を明らかにするためにスルフォキシド基の還元およびS-酸化反応について詳細に検討した。

1) スルフォキシド基の還元反応

ラットの腸内より内容物を採取して直接R-FSOおよびS-FSOの還元について検討した結果、R-FSOの方がS-FSOより速やかに還元された。好気および嫌気的な条件下での反応より、通性嫌気性菌にスルフォキシドの高い還元活性のあることが示唆された。腸内細菌のスルフォキシド基の不斉選択的還元について28種の菌株を用いて検討した結果、興味あることに検討した菌株のうち、それぞれR-FSOとS-FSOを特異的に還元する菌株が存在することが明らかになった。この選択性は他の光学活性な基質を用いた場合にも認められ、腸内細菌の興味ある特徴であると考えられた。

2) S-酸化反応

まず、4種の不斉選択的なS-酸化反応についてラット肝ミクロゾームを用いて速度論的解析を行なった結果、生体内ではFSからR-FSOが優先的に生成することが確認された。

一般に含硫黄化合物の酸化反応にはP-450とFMOが関与することが知られている。そこで、不斉選択的なS-酸化反応を触媒している酵素を明らかにするために、それぞれの酵素の阻害剤と活性化剤等を用いて検討した。FSからR-FSOへのS-酸化反応にはFMOとP-450の両酵素が、他の3種のS-酸化反応にはP-450が関与していることが示唆された。さらに、FMOが主にFSからR-FSOのS-酸化反応を触媒し、相互変換の選択性の主たる原因であることが示された。一方、P-450には多くの分子種が存在することが知られている。そこでP-450に対する抗体を用いてそれぞれのS-酸化反応に関与するP-450分子種について検討した結果、特にCYP3A分子種がFSからR-FSOへのS-酸化反応を除く3種のS-酸化反応に関与している主な分子種であることが明らかとなった。

以上、相互変換の選択性の原因は、FMOが選択的にFSからR-FSOの生成を触媒していることであった。そこで、ラット肝FMOをコードするcDNAを酵母に導入し、FMOを発現している形質転換酵母のミクロゾームを用いてFMOの不斉選択的なS-酸化反応について検討した結果、FMOの不斉選択的なS-酸化反応が実証された。さらに、不斉選択的なS-酸化反応を触媒するFMOの特性を利用した形質転換酵母を用いたバイオリクターとしての適用について検討し、スルフォキシド基を有する化合物の不斉選択的生産の有効的な手段に成りうることを示した。

3) ヒトにおける相互変換の可能性

ヒトとラットにおいて構成比は異なるが共通の腸内細菌が存在していることから、ヒトにおいてもスルフォキシド基の還元は腸内細菌によって触媒されると考えられた。次に、ヒト肝ミクロゾームを用いてS-酸化反応について検討した結果、4種のS-酸化反応が確認されたことより、ヒトにおいてもラットと同様なメカニズムで、相互変換が起こっている可能性が強く示唆された。

以上の結果より、フロセキナンの生体内での相互変換はスルフォキシド基の腸内細菌によるスルフィド体への還元とスルフィド体の生体内でのFMOとP-450によるスルフォキシド体への再酸化によって起こることが明らかになった。腸内細菌によるスルフォキシド基の還元とFMOとP-450によるスルフィド体の酸化反応についてはいくつかの報告があり、種々のスルフォキシド基を有する化合物で起こることが容易に推察される。すなわち、スルフォキシド基を含む光学活性な医薬品は生体内での相互変換が起こる可能性が極めて高く、薬効や毒性が異なる場合には重要な問題であり、相互変換の程度や選択性を見極めることが重要であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鎌 滝 哲 也

副 査 教 授 野 村 靖 幸

副 査 助 教 授 徳 光 幸 子

副 査 助 教 授 横 井 毅

学 位 論 文 題 名

薬物の光学異性体の体内における

相互変換メカニズムに関する研究

—不斉硫黄原子を含むフロセキナンを例として—

不斉硫黄原子に起因する光学異性体の体内動態に関する報告はほとんど行なわれていない。そこで、申請者は不斉硫黄原子に起因する光学異性体の体内動態について検討したところ、光学異性体の生体内相互変換が起こることを見いだした。そこで、そのメカニズムについても研究を進め、生体内における光学異性体の相互変換のメカニズムの詳細なメカニズムを明らかにした。本研究は不斉硫黄原子を有する化合物の生体内変換に関して新しい概念を提供するものであり、以下に詳述するように極めて優れた研究成果であると評価される。

1) フロセキナン (FSO)とその代謝物分離定量法の確立と体内動態

本研究では不斉硫黄原子を有するモデル化合物としてスルフォキシド基を有し、比較的構造が単純なフロセキナンを選択した。フロセキナンの代謝経路は単純で、主要な代謝物是不斉硫黄の酸化反応によって生成するスルフォン体 (FSO_2) と還元反応によって生成するスルフィド体 (FS) のみであり、不斉硫黄原子以外の部位での代謝がほとんど起こらないことから、モデル化合物として適していると考えられる。まず、光学異性体の体内動態を検討するために、フロセキナンの各異性体の分離定量と代謝物の FSO_2 と FS を同時に測定可能な HPLC による定量法を確立した。

本定量法を用いて、ラットにおける光学異性体の体内動態について検討した結果、フロセキナンは生体内で興味ある挙動を示すことを見出した。すなわち、一方の異性体をラットに経口投与すると、血漿中に他方の異性体が検出された。さらに、この相互変換には選択性があり、S-FSOからR-FSOへの変換が優位に起こった。

生体内相互変換の起こるメカニズムとして、光学不活性な代謝物であるFSあるいはFSO₂が、それぞれS-酸化および還元反応によって再度R-FSOとS-FSOに代謝されるためと推察した。そこでラットにFSとFSO₂を単回静脈内投与した結果、FSを投与した場合のみ血漿中にR-FSOとS-FSOが検出され、このときR-FSOがS-FSOより高い血漿中濃度を示した。

R-FSOとS-FSOを静脈内投与した場合の生体内での相互変換は経口投与した場合に比較して極めて少なく、無菌ラットおよび抗生物質で処理したラットにR-FSOとS-FSOを経口投与した場合には相互変換は認められなかった。したがって、フロセキナンは腸内細菌によって還元され、生成したFSが吸収されて体内で再びR-FSOとS-FSOにS-酸化されると推定した。

2) フロセキナン光学異性体の生体内相互変換のメカニズム：スルフォキシド基の還元反応

In vitro で肝臓と腎臓の可溶性画分を用いて検討した結果、アルデヒドオキシダーゼとチオレドキシン依存性の還元酵素によって還元反応が触媒されることが示されたが、その寄与は腸内細菌より小さいと考えられた。腸内細菌によるスルフォキシド基の不斉選択的還元について28種の菌株を用いて検討した結果、3種はR-FSOを、2種はS-FSOを特異的に還元することが明らかになった。

3) フロセキナン光学異性体の生体内相互変換のメカニズム：S-酸化反応

立体選択的なS-酸化について酵素化学的に証明するために、FSからR-FSOおよびS-FSOへのS-酸化、さらにR-FSOおよびS-FSOからFSO₂へのS-酸化についてラット肝ミクロゾームを用いて詳細に検討した。FSからR-FSOへのS-酸化反応にはFMOとP-450の両酵素が、他の3種のS-酸化反応にはP-450が関与していることが示唆された。また、肝ミクロゾームを用いて速度論的解析を行なった結果、FMOが主にFSから

R-FSOのS-酸化反応を触媒し、相互変換の選択性の主たる原因であることが示された。さらに、特にCYP3A分子種がFSからR-FSOへのS-酸化反応を除く3種のS-酸化反応に関与している主たる分子種であることを明かにした。

4) ヒトにおける相互変換の可能性

ヒトとラットの腸内には構成比は異なるが共通の腸内細菌が存在していることから、ヒトにおいてもR-FSOおよびS-FSOからFSへの還元は腸内細菌によって触媒されと考えられた。また、ヒト肝ミクロゾームを用いてS-酸化反応について検討した結果、4種のS-酸化反応が起こることが確認されたことより、ヒトにおいてもラットと同様なメカニズムで相互変換が起こっていると推察された。

以上、本研究は本論文「薬物の光学異性体の体内における相互変換メカニズムに関する研究—不斉硫黄原子を含むフロセキナンを例として—」に含まれる研究成果は薬学における基礎および応用のいずれにおいても優れており、博士（薬学）の学位を受けるに充分値するものと認めた。