

氏名(本籍)                    た            なか            より            ひさ  
   田            中            頼            久

学位の種類                    薬            学            博            士

学位記番号                    薬            第            238            号

学位授与年月日                昭和59年    3月14日

学位授与の要件                学位規則第5条第2項該当

学位論文題目                    新規抗炎症薬 Loxoprofen Sodiumの活性  
   代謝産物に関する研究

(主 査)

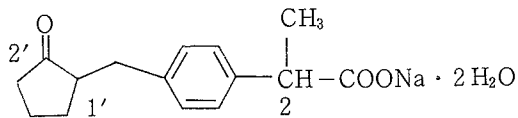
論文審査委員 教授 南 原 利 夫            教授 鶴 藤            丞

教授 高 野 誠 一

## 論 文 内 容 要 旨

Sodium 2 - [ 4 - ( 2 - oxocyclopentylmethyl ) phenyl ] propionate dihydrate (loxoprofen sodium) は、抗炎症、鎮痛及び下熱作用が強く、消化管障害作用は比較的弱い非ステロイド酸性系の新規化合物である。本研究においては、この薬物の代謝、とりわけ活性代謝物の生成に関わる反応を中心に種々検討した。

まず、loxoprofen sodium を経口投与したラットの尿から7種の代謝物 (M-0, M-1, M-2, M-3, M-4, M-5 及び M-6) をメチルエステルあるいはメチルエステル-ジアセテートとして単離した。それらはNMR 及びMS スペクトルから化学構造を推定し、標品との比較により同定した。また、M-0, M-1 及び M-2 についてはCD スペクトル並びに  $\alpha$ -phenylethylamide (-)-MTPA ester の HPLC 分析等により立体化学的検討も併せ行った。その結果、M-0 は未変化



Loxoprofen Sodium

体で、 $\alpha$ -phenylpropionic acid 側鎖の2位及びcyclopentanone環の1'位の不斉炭素はそれぞれ57%, 29% (S) enantiomer excess であった。M-1はケトン還元体のcis-alcoholで、2位不斉炭素は完全な(S)配位であるが、cis-alcohol部分はラセミ混合物であることが示された。活性代謝物であるM-2もケトン還元体であり、3個の不斉炭素が単一の(2S, 1'S, 2'S)配位から成るtrans-alcoholと同定された。これら絶対配置の解明から、loxoprofenの代謝における(2R)から(2S)配位への異性化及び $\alpha$ -置換cyclopentanone環の立体選択的還元が生起が示唆された。M-3はケトンの $\alpha$ 位が水酸化されたケトールで、1'位ベンジル置換基に関してtrans体とcis体の約2:1の混合物であった。M-4, M-5及びM-6はいずれも2', 4'-diol体であり、それらの相対配置はそれぞれ(1' $\alpha$ , 2' $\alpha$ , 4' $\alpha$ ), (1' $\beta$ , 2' $\alpha$ , 4' $\alpha$ )及び(1' $\beta$ , 2' $\alpha$ , 4' $\beta$ )と決定された。従って、M-4はcis-alcoholから、またM-5とM-6はtrans-alcoholからそれぞれ4'位炭素の直接水酸化によって生成することが明らかになった。更に、これら遊離型代謝物に加え、尿中にGlucosylase及び緩やかなアルカリ処理で水解されるエステル型グルクロナイドの存在が確認された。また、イヌ尿中にはtrans-alcoholのタウリン抱合体の存在が示唆されたが、合成標品とクロマトグラフィーにおける挙動を比較することにより確認された。

薬物代謝における動物種差の問題を明らかにすることはヒトにおける薬効・毒性の発現を類推

する上に極めて重要である。そこで、loxoqrofenの主代謝経路を確立し、併せて代謝にみられる種差を検討するため、<sup>14</sup>C標識体を経口投与したラット、マウス、イヌ及びサル、血漿並びに尿中代謝物を分離定量した。その結果、次のような代謝の特徴が明らかになった。すなわち、いずれの動物においても、最初に5員環ケトンが還元され cis-alcohol (M-1) と trans-alcohol (M-2, 活性代謝物) が生じる。この還元には立体選択性がみられ、熱力学的に安定な後者が優位に生成する。両ケトン還元体は各種動物の血漿中にみられる主代謝物であり、その他の代謝物は検出されない。また、trans-alcoholの血漿中レベルは動物種間で有意な差が認められない。ついで、これら monool 体は、ラットでは更に cyclopentanol 環の4'位が水酸化を受けて diol 体 (M-4, M-5 及び M-6) に変換され、主代謝物として、またマウスにおいてはこれら monool 体は主に遊離型のまま尿中に排泄される。一方、イヌではエステル型グルクロナイドに加え trans-alcohol のタウリン抱合体が主代謝物として生成し、またサルは monool 体を主にエステル型グルクロナイドとして尿中に排泄する。このように、loxoqrofenの代謝はケトンの還元で動物種による違いは見られないが、それにつづく monool 体の水酸化及び抱合に顕著な種差が認められた。因みに、ヒトにおける代謝は種々の点でサルのそれに類似している。

近年、非ステロイド酸性抗炎症薬の作用機序は、主にPG生合成阻害に基づくことが明らかにされている。かかる観点から本薬物について *in vivo*, *in vitro* 及び 3T6 培養細胞の3つの系を用い、この問題を検討した。Loxoqrofenをラットに投与すると PGE<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub> の尿中レベルは著しく減少し、その ID<sub>50</sub> (1.9 mg/kg) は抗カラゲニン足浮腫抑制作用にみられる ID<sub>50</sub> (1.2 mg/kg) とよく一致した。このことは loxoqrofen あるいはその代謝物が体内でPG生合成を阻害することを示唆するものである。しかし、薬物それ自身が示すウシ精のウミクロゾームのPG生合成阻害活性は極めて弱かった (IC<sub>50</sub>: 760 μM)。これに対し、ラットの血漿及び尿中から単離した trans-alcohol は、合成標品の (2S, 1'R, 2'S) - trans-alcohol と同程度の強い阻害活性 (IC<sub>50</sub>: 11 μM) を示し、この代謝物は loxoqrofen の活性本体であることが判明した。

(2S, 1'S, 2'R) - trans-alcohol に弱いPG生合成阻害活性 (IC<sub>50</sub>: 90 μM) が認められたが、これ以外の trans-alcohol 及び他の尿中代謝物には阻害活性は全くみられなかった。*in vivo* と *in vitro* をつなぐマウス胎仔由来の 3T6 線維芽細胞におけるPG生合成を、本薬物は IC<sub>50</sub> 1.6 μM という低濃度で阻害した。一方、loxoqrofen sodium は 3T6 細胞とインキュベートすると 1 hr で25%, 3 hr で40%が trans-alcohol へ変換され、培養細胞系においても活性代謝物がPGの生合成を阻害しているものと考えられた。これらの結果から、loxoqrofen は体内で速やかに活性代謝物の (2S, 1'R, 2'S) - trans-alcohol へ変換され、PG生合成阻害活性に基づく薬理作用を発現することが明らかになった。

さて、この活性代謝物の生成には α-置換 cyclopentanone 環の立体特異的還元と α-phenyl-

propionic acid 側鎖上 2 位不斉炭素の (R) から (S) への異性化が関与すると推測される。そこで、まず loxoprofen の 5 員環ケトン還元酵素 (loxoprofen 還元酵素) の性質を種々検討した。loxoprofen 還元活性は肝臓及び腎臓に強く認められ、105000 x g 上清画分に局在する。動物種のうち、最も強い活性を示したウサギの肝上清画分から各種クロマトグラフィーで精製し、ポリアクリルアミド電気泳動上単一バンドを示した loxoprofen 還元酵素は、分子量が 33000、補酵素として NADPH を要求し、6.2 に至適 pH を示した。PCMB、N-ethylmaleimide 等の SH 阻害剤及びケトン還元酵素の阻害剤 quercitrin は本還元活性を著しく抑制したが、アルコール脱水素酵素の阻害剤 (pyrazole) やアルデヒド還元酵素の阻害剤 (phenobarbital) 等は全く影響を及ぼさなかった。また、本精製酵素により各種芳香族アルデヒド並びにケトン、cyclohexanone、 $5\alpha$ - $3$ -ketosteroid 類はよく還元されたが、cyclopentanone、そのメチル置換体は全く基質にならなかった。しかし、2-ethyl-及び 2-n-propylcyclopentanone は還元され、2-benzyl 誘導体は loxoprofen に匹敵する速度で還元をうけた。これらの成績から、本酵素は沢田らにより  $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase と同定されたウサギ肝上清の芳香族アルデヒド-ケトン還元酵素の  $F_3$  と同一と考えられ、脂溶性基をもつ cyclopentanone 基質になることが判明した。さらに、loxoprofen の光学異性体 4 種について本酵素による還元を検討したところ、(1'R)-loxoprofen の  $V_{max}$  値は対応する (1'S)-isomer より約 3 倍大きく、生成物は trans-alcohol のみであった。この trans-alcohol が (1'R, 2'S) 配位を有することは明らかである。(1'S)-isomer からは trans-と cis-alcohol が同程度に生成した。また、ケト基から離れた  $\alpha$ -phenylpropionic acid 側鎖の絶対配置もケトンの還元速度に影響を及ぼし、(2S)-loxoprofen の  $V_{max}$  は (2R)-isomer の約 2 倍であった。従って、本酵素は loxoprofen の立体異性体 4 種のうち (2S, 1'R)-isomer を最も速く還元し活性代謝物の (2S, 1'R, 2'S)-trans-alcohol のみを生成することになる。

前述のように、loxoprofen では、 $\alpha$ -phenylpropionic acid 側鎖上の (2R) から (2S) 配位への異性化が示唆されたので、本反応の生起を明らかにするため検討を加えた。まず、(1S)-1-(naphthalen-1-yl)ethylamine を出発原料とする新しい方法によりカルボン酸に対する光学活性試薬 (1S)-1-(4-dimethylaminonaphthalen-1-yl)ethylamine を合成した。この誘導体化試薬を用いてラット血漿中の loxoprofen 及び monool 体を diastereoamide に導き、HPLC 分析により (2S)/(2R) 比を求めた。ラセミ及び (2R)-loxoprofen を投与後の未変化体及び trans-alcohol の (2S)/(2R) 比は時間と共に増大したが、(2S)-loxoprofen 投与後の (2S) 配位は完全にそのまま保持された。この結果、ラットにおける (2R)-から (2S)-loxoprofen への一方的な異性化が明らかにされた。また、trans-及び cis-alcohol を投与後、それぞれ血漿中 monool 及び loxoprofen を分析した結果、次のような事実が明らかに

なった：(1) monool 体においても異性化反応が生起する，(2) cis-alcohol は容易に酸化されて loxoprofen に戻り，更に trans-alcohol へ変換されるが，trans-alcohol は少量の loxoprofen を与えるのみで cis-alcohol を生成しない。これは loxoprofen と trans-alcohol の平衡がアルコール側へ大きく片寄っているためと考えられる。このことは，trans- 及び cis-alcohol-<sup>14</sup>C を投与したラット尿中代謝物の分析結果からも支持された。本異性化反応は，活性代謝物の 2 位不斉炭素の絶対配置が (S) であることを考えるとき，その生成に好都合に働いていることになる。

最後に，この異性化反応の機構を，loxoprofen と同じ側鎖構造を有する 2-(2-isopropylindan-5-yl)-propionic acid (IIPA) の  $\alpha$ -メチル基 (CD<sub>3</sub>) 及び  $\alpha$ -メチレン基 (D<sub>1</sub>) の両重水素標識体を用いて検討した。(2R)-IIPA-CD<sub>3</sub> を経口投与したラット尿より単離された主代謝物，tert-alcohol は正の旋光度 ( $[\alpha]_D + 45.1^\circ$ ) を有し，NMR 及び MS スペクトルから重水素を完全に 3 個保持していることが判明した。しかし，IIPA-D<sub>1</sub> を投与したときの tert-alcohol ( $[\alpha]_D + 47.8^\circ$ ) の NMR 及び MS スペクトルは明らかに標識重水素を 50% 消失していることを示した。これらの結果は，Wechter らにより提唱されたヒトにおける ibuprofen の異性化機構，すなわち exomethylene (-C(=CH<sub>2</sub>)-COOH) を中間に経る説に矛盾し，acyl CoA thioester のような活性化された中間体の関与が示唆された。この機構は，ごく最近中村らにより実証されるにいたった。

以上，loxoprofen の代謝に関する研究から，本薬物は体内で活性代謝物の (2S, 1'R, 2'R)-trans-alcohol に変換されたのち，PG 生合成阻害活性により薬理作用を発揮することが証明された。また，この活性代謝物の生成には 5 員環ケトンの立体特異的還元，一部生成する cis-alcohol の loxoprofen を経由する trans-alcohol への変換並びに  $\alpha$ -phenylpropionic acid 側鎖上 2 位不斉炭素の (R) から (S) 配位への異性化という 3 つの酵素反応が，いずれも立体化学的に極めて好都合に関与していることが明らかになった。

## 審査結果の要旨

本研究は、薬効・毒性との関連から新規抗炎症薬 loxoprofen sodium の代謝並びに作用発現の機作を明らかにし、ヒトにおける動態解析の基礎資料を得ることを目的としたものである。

まず loxoprofen sodium を投与したラット尿から7種の主代謝物を単離し、NMRおよびMSスペクトルの解析などから、それらの構造を推定、標品との比較により同定した。このときケトン還元体の trans-alcohol については、単一の(2S, 1'R, 2'S)配位を有することを証明した。ついで抱合型代謝物を精査し、ケトンの還元動物種差はみられないが、それに続く水酸化および抱合には著しい種差があることを明らかにした。

非ステロイド酸性抗炎症薬の作用機作は、PGの生合成阻害にもとづくとして示されているが loxoprofen sodium それ自体は *in vitro* できわめて弱い阻害活性しか示さない。しかし、体内におけるPG産生の指標となる尿中PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>の量を著しく減少させ、また血漿、尿から単離された trans-alcohol は、合成標品の(2S, 1'R, 2'S)-trans-alcohol と同程度のPG生合成阻害活性を示すことなどから代謝活性化が示唆された。

この活性代謝物の生成に関与するケトン還元酵素の性質をウサギ肝上清画分からの精製標品について検討した結果、沢田らにより3α-hydroxysteroid dehydrogenase と同定された芳香族アルデヒド・ケトン還元酵素のひとつと同一であることが判明した。本酵素は、loxoprofen 立体異性体4種のうち(2S, 1'R)体を最も速やかに還元し、活性代謝物の(2S, 1'R, 2'S)-trans-alcohol のみを生成した。

つぎに loxoprofen および血漿中主代謝物の trans- および cis-alcohol は、α-フェニルプロピオン酸側鎖の絶対配置が(R)から(S)配位へ不可逆的に異性化すること並びに trans-alcohol の水酸基は酸化を受けにくい、cis-alcohol は容易に酸化され、さらに trans-alcohol に変換されることを明らかにした。この異性化反応は、重水素で標識した2-(2-isopropylindan-5-yl) propionic acid の尿中代謝物を精査した結果、α-メチル基ではなくα-メチル基の重水素の脱離によって起こり、exomethylene 中間体を經由する機構では説明できない別の機構によることを証明した。

以上、本論文はα-アリルプロピオン酸系抗炎症薬 loxoprofen sodium の体内変換を検討し、その代謝様式がPG生合成阻害活性のつよい(2S, 1'R, 2'S)-trans-alcohol の生成にきわめて好都合に働いていることを明らかにしたものであり、学位論文として十分価値ある内容と認める。