



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

新規 rifamycin誘導体 rifalazil
の代謝に関する生化学的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 前, 辰正 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2289

氏 名 (本籍)	前 辰 正 (広 島 県)		
学 位 の 種 類	博士 (農学)		
学 位 記 番 号	農博乙第 4 4 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 2 年 3 月 1 4 日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
学 位 論 文 題 目	新規 rifamycin 誘導体 rifalazil の代謝に関する 生化学的研究		
審 査 委 員	主査	岐阜大学 教授	中 村 孝 雄
	副査	岐阜大学 教授	上 吉 道 治
	副査	信州大学 教授	太 田 克 明
	副査	静岡大学 教授	番 場 公 雄
	副査	岐阜大学農学部 教授	小 森 成 一

論 文 の 内 容 の 要 旨

1966 年、抗結核薬 rifampicin が開発されて以来、rifamycin 誘導体は開発されていなかったが、1990 年代になって rifabutin 及び rifapentine が開発され、また、現在 rifalazil が開発中である。これらの rifamycin 誘導体は結核菌や MAC などのマイコバクテリアに対して強い抗菌活性を有している。本論文は、新規 rifamycin 誘導体 rifalazil の代謝、及び代謝面での薬物相互作用を明らかにするために行った研究をまとめたものである。

Rifalazil の代謝経路を明らかにするために、rifalazil を経口投与したイヌ及びマウスの尿から 4 種類の主要代謝物、25-deacetyl-rifalazil(M1), 30-hydroxy-rifalazil(M2), 25-deacetyl-30-hydroxy-rifalazil(M3) 及び 32-hydroxy-rifalazil(M4) をそれぞれ単離し、同定した。これらの代謝物の構造を調べた結果、rifalazil の代謝経路は 25 位の脱アセチル化ならびに 30 位あるいは 32 位の水酸化であることを示した。

Rifalazil 代謝物の抗菌活性を測定した結果 M1 及び M4 は rifalazil と同様にグラム陽性細菌及びマイコバクテリアに対して rifampicin よりも高い抗菌活性を示していた。一方、M2 は rifalazil、M1 や M4 よりも活性が低いことが明らかになった。

ヒトでの rifalazil の薬効及び毒性を予測する上で最適の動物モデルを見つけるため、動物及びヒトの肝ミクロソーム及び全血を用いて、*in vitro* 代謝実験により検討した。肝ミクロソームによって生成する rifalazil 代謝物は、マウスで M4、イヌでは M1 及び M2、サルで水酸化代謝物 (M2 あるいは M4) ならびに未知代謝物、ヒトで M1 及び M4 であり、ラット及びモルモットでは生成しない。全血において生成する rifalazil 代謝物は、マウス及びラットで M1 であり、イヌ及びヒトでは代謝物は生成しなかった。これらの結果から、動物及びヒトに rifalazil を投与したときの代謝を *in vitro* 代謝実験系において再現できることが示され、rifalazil 代謝における種差が明らかになった。また、ヒトにおける rifalazil 代謝は、

同一の代謝物が生成する点でマウスと似ており、脱アセチル化及び水酸化代謝反応が肝ミクロソームで起る点でイヌと似ていることが示された。これらの結果より、ヒトでの rifalazil の薬効及び毒性を予測するためには、マウスが最も有用であり、また、M1 が生成することからラット及びイヌも適している。特に、イヌの場合はヒトと同様に代謝反応が肝ミクロソームで起ることから、肝機能に関わる毒性を見る場合にはよいモデルとなるものと考えられる。

Rifalazil 代謝酵素を同定するために、ヒト肝臓由来の試料を用いて検討した。ヒト肝ミクロソーム、サイトゾール、S9 を用いて rifalazil を代謝させた結果、M1 及び M4 は、ミクロソーム、S9 で生成したが、サイトゾール画分では検出されなかった。よって、rifalazil 代謝酵素は、肝ミクロソームに存在することが明らかとなった。M1 を生成する rifalazil 脱アセチル化代謝反応は加水分解反応であり、NADPH に依存しないことから、エステラーゼの一種であると考えられた。ヒト肝ミクロソームを用いたエステラーゼ阻害剤による rifalazil 代謝阻害を検討した結果、M1 生成は β -エステラーゼの阻害剤である有機リン酸及びコリンエステラーゼ阻害剤によって阻害されたが、アシルエステラーゼ阻害剤では阻害されなかった。このことから rifalazil 脱アセチル化代謝酵素は、 β -エステラーゼであることが明らかになった。M4 を生成する rifalazil 水酸化代謝反応は NADPH に依存することからチトクローム P-450 の一種であると考えられた。ヒト肝ミクロソームを用いた CYP 特異的阻害剤による rifalazil 代謝阻害を検討した結果、M4 生成は CYP3A4 阻害剤によって阻害された。また、ヒト CYP 発現系を用いた rifalazil 代謝を検討した結果、M4 は CYP-3A3 及び CYP3A4 によって生成した。以上の結果より、rifalazil 水酸化代謝酵素は CYP-3A4 であることが明らかになった。

Rifalazil の代謝面での薬物相互作用を予測するため、ヒト肝ミクロソームでの rifalazil 代謝に及ぼす臨床薬剤の影響を調べた結果、rifalazil 水酸化反応は、CYP3A4 によって代謝される薬物によって阻害された。従って、rifalazil と CYP3A4 によって代謝される薬物との併用には注意しなければいけないと考えられるが、臨床試験によってその影響を調べる必要がある。マウス、ラット、イヌにおいて薬物代謝酵素誘導に及ぼす rifalazil の影響を調べた結果、rifampicin 及び rifabutin は、CYP3A を顕著に誘導するが、rifalazil は全く影響を与えないことが明らかになった。よって、既存 rifamycin 誘導体は、薬物代謝酵素を誘導するという問題を内包しているのに対して、rifalazil はこの問題を解決した新規誘導体であることが示唆された。

以上のように、本論文は新規 rifamycin 誘導体の rifalazil の代謝、すなわち代謝物の構造と抗菌性、代謝経路、代謝における種差、代謝酵素ならびに代謝面での薬物相互作用について検討し、その結果をまとめたものである。

審 査 結 果 の 要 旨

現在、病原菌、主として結核菌や MAC(Mycobacterium avium complex)などのマイコバクテリアを対象として、3つの rifamycin 誘導体である rifampicin, rifabutin および rifapentine が認可されている。しかしこれらの誘導体は薬物相互作用、特に薬物代謝酵素誘導とい

う代謝に関する未解決の問題を内包している。

本申請者グループは、rifamycin 誘導体を探査し、マイコバクテリア、*helicobacterphlori*、クラミジアならびにブドウ球菌に対して、既存 rifamycin 誘導体よりも強い抗菌性を有する rifalazil を新規に開発した。

本研究は、新規に合成した rifalazil について、その薬物の体内動態ならびに代謝面での薬物相互作用を追求し、その結果を本論文の第 1 章～第 4 章にまとめたものである。

第 1 章では、rifalazil の体内代謝経路を明らかにするために、イヌおよびマウスを供試して 4 種類の代謝物 M₁~M₄(metabolite-1 of rifalazil, M₁, 以下 M₂, M₃, M₄)を単離し、その構造を同定した。また、ヒトの尿からは 4 種類の代謝物のうち M₁ および M₄ のみを検出した。

以上の代謝物を詳細に検討した結果、rifalazil の代謝経路は 25 位の脱アセチル化ならびに 30 位あるいは 32 位の水酸化であることを明らかにした。

第 2 章では、rifalazil の薬効および毒性を予測する上で最適な実験モデルを見つけるために、ヒトに対して、サル、イヌ、ラットならびにマウスを供試して、その代謝を検討した。その結果、ヒトおよびイヌ肝ミクロソームによる rifalazil 脱アセチル化代謝 (M₁ 生成) については NADPH に依存しないが、水酸化代謝 (M₂ および M₄ 生成) には NADPH が必要であり、チトクローム P-450 による代謝反応であることを証明した。同時に、ヒトにおける rifalazil 代謝は、主要代謝物が同一であることからマウスに似ており、ヒトでの薬効および毒性予測をするためにはマウスが最も有用な動物種であることを示した。

第 3 章では、前章の結果に基づいて代謝酵素の存在部位ならびに性質を調べた。M₁ および M₄ はミクロゾーム画分および S₉ 部分に存在し、代謝阻害実験の成績を合わせて検討した結果、M₁ を生成する脱アセチル化代謝酵素は β -エステラーゼであり、M₄ を生成する水酸化酵素は CYP3A4(cytochrome P-450)であると同定した。

第 4 章は、薬物代謝酵素に及ぼす rifalazil の影響について検討した。既存の rifamycin 誘導体は、薬物代謝酵素を誘導し、併用薬との代謝面での薬物相互作用を起こすことが知られている。そこで本章では、マウス、ラット、イヌにおいて、肝ミクロソーム中の薬物代謝酵素を測定した結果、rifalazil はチトクローム b₅ 含量を有意に上昇させたが CYP3A の誘導は認められなかった。また、13 週間反復経口投与しても、肝ミクロソーム中の薬物代謝酵素活性は全く影響を受けなかったことから、既存 rifamycin 誘導体とは異なり、薬物代謝酵素誘導を原因とする薬物相互作用を起こさないと結論した。

以上の論文は、新薬を開発する上において必須の課題である開発化合物の薬理、薬効および毒性に加え、薬物体内動態を明らかにしたものであり、その論文構成や内容において学術的に価値があるものと判断された。

その結果、審査員全員が一致して、本論文は岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文(A),ならびに参考となる既発表学術論文(B)は以下のとおりである。

[A]

1. Mae, T., Hosoe, K., Fujii, K., Yamashita, K., Yamane, T., Hidaka, T., and Ohashi, T.: *In vitro*

- metabolism of a rifamycin derivative by animal and human liver microsomes, whole blood and expressed human CYP3A isoform. *Xenobiotica*, 26:793-802, 1996.
2. Mae, T., Hosoe, K., Yamamoto, T., Hidaka, T., Ohashi, T., Kleeman, J.M., and Adams, P.E.: Effect of a new rifamycin derivative, rifalazil, on liver microsomal enzyme induction in rat and dog. *Xenobiotica*, 28:759-766, 1998.
 3. Mae, T., Konishi, E., Hosoe, K., and Hidaka, T.: Isolation and identification of major metabolites of rifalazil in mouse and human. *Xenobiotica*, 29:1073-1087, 1999.
 4. Mae, T., Inaba, T., Konishi, E., Hosoe, K., and Hidaka, T.: Identification of enzymes responsible for rifalazil metabolism in human liver microsomes. *Xenobiotica*. *in press*, 2000.
- [B]
1. Fujii, K., Saito, H., Tomioka, H., Mae, T., and Hosoe, K.: Mechanism of action of antimycobacterial activity of the new benzoxazinorifamycin KRM-1648. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1489-1492, 1995.
 2. Hosoe, K., Mae, T., Yamashita, K., Fujii, K., Yamane, T., Hidaka, T., and Ohashi, T.: Identification and antimicrobial activity of urinary metabolites of a rifamycin derivative in dog. *Xenobiotica*. 26: 321-332, 1996.
 3. Hosoe, K., Mae, T., Konishi, E., Fujii, K., Yamashita, K., Yamane, T., Hidaka, T., and Ohashi, T.: Pharmacokinetics of KRM-1648, a new benzoxazinorifamycin, in rats and dogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2749-2755, 1996.