

分担研究報告書

質量分析計を用いたメタボロミクス手法による毒性マーカー検索法の開発

分担研究者 堀 弥 杏林製薬株式会社 創薬研究所 副主任研究員
分担研究者 矢本 敬 第一三共株式会社 安全性研究所 第七グループ長
分担研究者 宮田昌明 東北大学大学院薬学研究科 助教

研究要旨 ヒトへの応用が簡便な、尿などの非侵襲試料を用いた新規メタボロミクス高感度安全性予測系の確立を目的として、ヒトで肝障害の発生が報告されているアセトアミノフェン（APAP）のラット肝障害モデルについて、質量分析計を用いたメタボロミクス解析を行った。本研究では、前年度までの APAP 投与量を変化させるのではなく、APAP 投与量を一定にして、肝障害の軽減に寄与する薬物を併用した実験系により肝障害のバイオマーカー探索法の開発を試みた。APAP 誘発肝障害に対するアンドロスタノール並びにケトコナゾールの併用により、APAP 誘発肝障害はいずれも軽減した。既存の肝障害マーカー（ALT 活性の対数値）と質量スペクトル強度との間の相関性に着目して新規バイオマーカーを探索した。APAP 単独群と併用群間の統計解析を実施したところ、logALT に対して負あるいは正の相関をする質量数を複数抽出することができた。最後に、これまでの APAP 誘発肝障害研究から得られたバイオマーカー候補 20 種のケトコナゾール併用試験における変化について検討した。その結果、5 種の質量数（313.60, 345.48, 347.56, 347.62, 388.43）においてケトコナゾール併用時の logALT と同様に有意な減少が認められた。以上のように非侵襲試料のメタボロミクス手法による解析から新規肝障害マーカーの探索法を検討し、薬物性肝障害モデルの尿成分からバイオマーカー候補の抽出に至ることが可能となった。

A. 研究目的

ヒトへの応用が簡便な、尿などの非侵襲試料を用いた新規メタボロミクス高感度安全性予測系の確立を目的として、ヒトで肝障害の発現が報告されている薬剤について質量分析(MS)によるメタボロミクス手法の開発ならびに毒性および薬効と細胞環境

変化に基づく内因性物質の代謝変動情報との相関に関する知見を得る。具体的には、ヒトで肝障害が報告されているアセトアミノフェン（APAP）のラット肝障害モデルから得られた尿などの試料を用いてメタボロミクス解析法とバイオマーカー探索法について検討する。今年度はこれまで行った APAP 投与量を変化させるのではなく、

APAP 投与量を一定にして、肝障害の軽減に寄与する薬物を併用する実験系を用いた。本研究では、APAP 誘発肝障害の軽減に寄与する薬物として核内受容体 CAR のインバースアゴニストであるアンドロスタノール並びに薬物代謝酵素チトクローム P450 阻害作用を持つケトコナゾールを用いて肝障害のバイオマーカーの抽出を実施した。

B. 研究方法

1. 試験施設および所在地

1-1. 動物実験

試験施設：第一三共株式会社 安全性研究所

所在地：静岡県袋井市堀越 717

1-2. MS 測定および解析

試験施設：杏林製薬株式会社 創薬研究所

所在地：栃木県下都賀郡野木町 2399-1

2. 試薬

アセトアミノフェン (APAP, シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社)

アンドロスタノール (AND, Steraloids)

ケトコナゾール (KCZ, シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社)

カルボキシメチルセルロースナトリウム (和光純薬工業株式会社)

コーンオイル (和光純薬工業株式会社)

Tween-80 (和光純薬工業株式会社)

アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社)

アセトニトリル (HPLC 用, 関東化学)

ギ酸アンモニウム (特級, 関東化学)

3. 使用機器

冷却遠心機 CF7D2 (日立工機株式会社)

遠心機 LC06-SP (株式会社トミー精工)

自動分析装置 TBA-2000FR (東芝メディカル株式会社)

遠心機 5415D (Eppendorf)

LC-MS/MS システム

MS/MS Quattro Ultima (Micromass)

データ処理装置 MassLynx 4.0

Infusion pump Model 100 (NEUROSCIENCE, INC.)

4. 実験動物

8 週齢の雄性 F344/DuCrIj ラット (日本チャールス・リバー株式会社) を購入し、1 週間環境に馴化させた後、9 週齢で試験に使用した。動物室の環境は $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照明 12 時間/日 (7 時-19 時) に設定した。動物は、馴化期間および前処置投与期間にはラット用ブラケットケージ (有限会社新東洋製作所) で個別飼育し、APAP 投与後にラット用ステンレス製メタボリックケージ (小原医科産業株式会社) に移して個別飼育した。放射線 (30 kGy, ^{60}Co - γ 線) を照射した固形飼料 (Certified Rodent Diet 5002: PMI Nutrition International, Inc.) と 7 ppm クロール水 (自動給水装置) をそれぞれ自由に摂取させた。

5. 被験物質、投与用量および投与方法

5-1. アンドロスタノール・アセトアミノフェン併用試験

APAP の投与用量は 800 mg/kg とし、投与容量はラットの体重 100 g あたり 1 mL とした。AND の投与用量は 0, 100 および 200 mg/kg とし、投与容量はラットの体重 100 g あたり 1mL とした。各個体の投与容量は投与日に測定した体重に基づいて算出した。被験物質 APAP はガラス製注射筒(株式会社夏目製作所)と金属製胃ゾンデ(株式会社夏目製作所)を用いて強制経口投与し、AND は腹腔内投与した。投与スケジュールは、AND を APAP 投与後 2 回 (10:00, 13:30) 投与した。

5-2. ケトコナゾール・アセトアミノフェン併用試験

KCZ の投与用量は 100 mg/kg とし、投与容量はラットの体重 100 g あたり 1 mL とした。APAP の投与用量は 800 mg/kg とし、投与容量はラットの体重 100 g あたり 1 mL とした。各個体の投与容量は投与日に測定した体重に基づいて算出した。被験物質はガラス製注射筒と金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与スケジュールは、前処置として KCZ を 4 日間投与し、KCZ 投与 4 日目に APAP を単回投与した。

6. 群構成

投与 1~3 日前に体重の平均値および分散に大きな差が出ないように群分けを行った。各群は雄 5 例で構成した。

7. 検体調製

APAP の溶媒には注射用水(大塚製薬株式会社)にカルボキシメチルセルロースナトリウムを 0.5% の割合で添加したものを使用し、APAP の 8% 懸濁液を調製した。

AND はコーンオイルに 1% および 2% となるように溶解した。KCZ の溶媒には 0.1N 塩酸-生食水を用い、KCZ の 1% 溶液を調製した。

8. 尿サンプル採取

アジ化ナトリウムを 1% になるように注射用水に溶解した。この溶液 1 mL を防腐剤として 50 mL 遠心分離用コニカルチューブ(ベクトンディッキンソン)に入れ、メタボリックケージの尿回収ロート部の下端にチューブを固定した。チューブの周囲をドライアイスで冷却した状態で、APAP 投与後 24 時間で排泄される尿を採取した。尿採取後、尿を室温で融解し、遠心分離 (3000 rpm, 5 min) した。この上清の容量をメスピペットで測定し、尿量とした。尿は分注し分析に用いるまで -80°C で保存した。

9. 採血および組織サンプル採取

APAP 投与 24 時間後に各個体の体重を測定した。次いで、エーテル麻酔下で、テルモ注射針 (18G: テルモ株式会社) を取り付け付けたテルモシリンジ (10 mL: テルモ株式会社) を用いて腹大動脈から全採血することにより安楽死させた。解剖して肉眼的観察を行った後、肝臓および腎臓を採取し、重量を測定した。得られた血液は凝固促進型分離剤入りスピッツ管 (コアラ・チューブ S: 株式会社シノテスト) に注入し、室温で約 30 分間放置した。その後、冷却遠心機で遠心分離 (4°C, 3000 rpm, 10 min) して血清を得た。血清は 0.5 mL を血液化学的検査に使用した。残りは分注し分析に用いるまで -80°C で保存した。

1 0. 血液化学的検査

得られた血清を用いて自動分析装置で検査を実施した。以下に検査項目を示す。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), アルカリホソファターゼ (ALP), 総ビリルビン (T.BIL), 総コレステロール (T.CHO), トリグリセライド (TG), グルコース (GLU), 総タンパク (T.PRO), アルブミン (ALB), A/G 比 (A/G), 尿素窒素 (UN), クレアチニン (CRE), カルシウム (Ca), 無機リン (IP), ナトリウム (Na), カリウム (K), クロール (Cl)

1 1. 病理組織学的検査

採材した肝臓および腎臓は 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し, 常法に従って病理組織標本を作製した。病理組織標本はヘマトキシリン・エオジン染色を施し, 光学顕微鏡で観察した。

1 2. MS 用試料の調製

併用薬の有無を含む APAP 誘発肝障害モデル (各 5 例) のラット尿, 血清および肝臓について, 以下の方法で MS 用試料を調製した。得られた尿 10 μ L にアセトニトリル 20 μ L とアセトニトリル/0.2%ギ酸アンモニウム水溶液 (1/1, v/v) 200 μ L を添加し, 攪拌後 MS 測定試料とした。

1 3. MS 測定条件

MS 測定試料をシリンジに 150 μ L 採取し, 以下の条件で MS スペクトルを採取した。

Infusion rate 10 μ L / min

Ion source Electrospray ionization

(ESI)

Ion mode Positive (PIM) and negative ion mode (NIM)

Resolution power Unit mass

Scan mode Full scan mode (Q1)

Scan range m/z 100 ~ 1,000

Scan speed 900 amu / 1sec

Scan time 30 sec

Data points 14,303

Data mode MCA

Capillary voltage 3.0 (-) / 3.5 (+) kV

Cone voltage 50 V

Source temp. 90 °C

Desolvation temp. 120 °C

Cone gas flow 72 L/hr

Desolvation gas flow 650 L/hr

1 4. 統計学的方法

1 4-1. 動物実験

体重, 器官重量, 臓器/体重比, 尿量および血液化学的検査値は, 統計解析パッケージ SAS® System Release 8.2 (SAS Institute Inc.) を用いて処理し, 平均値と標準偏差を算出した。APAP 投与群と併用群の平均値の有意差検定は, AND・APAP 併用試験については Dunnett 検定を用いて, KCZ・APAP 併用試験については t 検定を用いて行い, いずれも有意水準を 0.1%, 1% および 5% とした。

1 4-2. 主成分分析および相関係数

得られた MS スペクトルは質量数を小数点以下 2 桁で表記し, Microsoft EXCEL 2000 に取り込んだピーク強度を 1000 分の 1 にして, 統計解析パッケージ SAS®

System Release 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いて主成分分析 (PCA, principal component analysis) を行った。

APAP 群および AND 併用群については、既存の肝障害マーカー (ALT 活性の対数値) と得られた MS スペクトルの相関係数を Microsoft EXCEL2000 で算出し、上位の質量数については、APAP 投与群と併用群の平均値の有意差検定 (Dunnnett 検定 有意水準: 0.1%, 1% および 5%) を実施した。

APAP および KCZ 併用群については、これまでに抽出されたバイオマーカー候補の質量数について APAP 投与群と併用群の平均値の有意差検定 (t 検定 有意水準: 0.1%, 1% および 5%) を実施した。

C. 研究結果

1. アンドロスタノール・アセトアミノフェン併用試験

1-1. 血液化学検査および病理組織学的検査

Table 1 に解剖時の病理学的検査および血液化学的検査の結果を示す。個体間のバラツキが大きく、統計的には有意ではないが、AND の用量依存的に ALT, AST および肝細胞壊死が軽減される傾向が観察され、APAP 肝障害の軽減が認められた。

1-2. MS スペクトルによる APAP 代謝物の解析

尿の負イオンモードの MS スペクトルにおいて、APAP 投与群では質量数 (m/z) 150, 230, 311, 326 に顕著なピーク強度の増加が認められ、それぞれ APAP および尿中代謝物として知られている APAP の硫酸抱合体 (APAP-S), N-アセチルシステイン抱合体

(APAP-NAC) およびグルクロン酸抱合体 (APAP-G) の擬分子イオン $[M \cdot H]^-$ に相当した (Table 2)。APAP 処置と AND の 100 および 200mg/kg 併用時の APAP および代謝物の質量スペクトルのピーク強度を比較したところ、AND 併用により、用量依存的に代謝物のピーク強度の増加傾向が認められた。特に APAP-NAC のピーク強度は有意に増加した。

1-3. 新規バイオマーカーの探索

血清 ALT 活性は AST 活性と同様に肝障害の病理所見を良く反映したことから、個体毎の血清 ALT 活性と AST 活性には相関係数で 0.9 以上の良好な相関が認められたことから、血清 ALT 活性を基準として、新規バイオマーカーの探索を試みた。すなわち、個体毎の血清 ALT 活性の対数値と MS スペクトルのピーク強度との相関性を利用して、バイオマーカー候補を抽出し、さらに APAP 群に対する有意差検定を実施して絞り込んだ。

負イオン MS スペクトルから得られた 6 種の質量数は、いずれも logALT と負の相関性を示し、相関係数二乗が大きい順に、m/z 428.23, 466.55, 213.34, 445.69, 274.68, 213.27 であった (Table 3)。いずれも logALT と同様に APAP 群に対して、AND 200mg/kg 併用群で有意な差が認められた。

正イオン MS スペクトルから得られた 6 種の質量数は、いずれも logALT と正の相関性を示し、相関係数二乗が大きい順に、m/z 389.65, 389.53, 347.56, 347.63, 306.79, 336.51 であった (Table 4)。いずれも logALT と同様に APAP 群に対して、

AND 200mg/kg 併用群で有意な差が認められ、 m/z 347.56 および 347.63 では、AND 100mg/kg から有意な差が認められた。

2. アセトアミノフェン・ケトコナゾール併用試験

2-1. 血液化学検査および病理組織学的検査

Table 5 に解剖時の病理学的検査および血液化学的検査の結果を示す。KCZ 併用群に ALT, AST および総ビリルビンの有意な低下が観察され、APAP 肝障害の軽減が認められた。

2-2. MS スペクトルによる APAP 代謝物の解析

APAP および KCZ 併用時の APAP および代謝物の質量スペクトルのピーク強度を比較したところ、KCZ 併用により、代謝物の APAP-S のピーク強度が有意に増加した。一方、APAP, APAP-NAC, APAP-G では有意な変化は認められなかった (Table 6)。

2-3. 新規バイオマーカーの探索

これまでに抽出されたバイオマーカー候補の質量数は、負イオンモードで 9 種 (2005 年度 3, 2007 年度 6), 正イオンモードで 11 種 (2005 年度 3, 2006 年度 2, 2007 年度 6) であった。これらの質量数のピーク強度について APAP 投与群と KCZ 併用群の平均値の有意差検定 (t 検定 有意水準: 0.1%, 1% および 5%) を実施した。

その結果、KCZ 併用群の正イオンモードで 5 種の質量数 (m/z 313.60 ***, 345.48 **, 347.56 **, 347.62 *, 388.43 *) において、 \log ALT と同様に有意な減少が認められた

(Table 7)。

D. 考察

医薬品の開発ならびに安全性研究において、現在トキシコゲノミクス手法を導入した研究が進められており、毒性発現時の遺伝子発現情報と既存毒性試験情報の組み合わせにより、毒性発現に関して多くの情報が得られてきた。しかし実際には種差のあるヒトの毒性を詳細に予測することは難しく、その予測にはトキシコゲノミクス研究で得られた遺伝子の発現情報に加えて、毒性によって生じた細胞環境の変化を高感度に検出する手法の組み合わせによる、細胞維持・エネルギー代謝系に関わる内因性物質の代謝変動の経時的な情報が必須である。そこで本研究では、ヒトへの応用が簡便な、尿などの非侵襲試料を中心として用いた新規メタボロミクス高感度安全性予測系の確立を目的として、肝障害モデル動物の試料を用いて手法の開発と解析を実施した。

先の検討から、APAP 投与後 24 時間の蓄尿について、簡便な前処理後、質量分析計に導入し、negative および positive ion mode でそれぞれ低分子量域の m/z 100~1,000 の質量スペクトルと既存の肝障害マーカーとの相関性を検討することにより、新規なバイオマーカー候補を抽出する手法を見出すに至っている。

本研究では、APAP 投与量を一定にし、肝障害の軽減に寄与する薬物を併用することで、障害の程度を変動させバイオマーカーの抽出を実施した。さらに MS スペクトルの中の APAP 代謝物について比較解析し、併用薬の APAP 代謝への影響についても評価した。併用薬として選択した AND およ

び KCZ は、いずれも薬物代謝酵素の代謝能を直接あるいは間接的に阻害することが知られている。APAP に併用することで、APAP 誘発肝障害の原因物質である NAPQI の肝臓内での生成量を減少させ、肝障害の軽減に寄与するものと期待した。その結果、併用によりそれぞれ APAP 誘発肝障害の軽減が認められた。一方、APAP の代謝物の排泄挙動は、AND 併用では APAP-NAC のピーク強度の増加が、KCZ 併用では APAP-S のピーク強度の増加が認められ、異なることが明らかとなった。このようにメタボロミクス解析は、併用薬による内因性物質の変化と共に、薬物の代謝物のパターン変化についても容易にかつ網羅的に捉えられる点で、極めて有力な解析手法である。

本研究では APAP 投与量を一定にし、障害を軽減させる薬物を併用する実験系においても、肝障害マーカーと良好な負あるいは正の相関性を示す質量数を複数抽出することができた。しかしながら、負の相関を示す場合には、併用薬あるいはその代謝物に由来した質量数である場合も考慮しなければならない。これらの質量数については更なる検討が必要と思われた。また、APAP・AND 100mg/kg 併用群から有意な変化が認められた m/z 347.56 および 347.63 は、既存の肝障害マーカーよりも鋭敏に変化していることから、有力な新規バイオマーカー候補と考えられた。

これまでに抽出されたバイオマーカー候補の質量数は、負イオンモードで 9 種、正イオンモードで 11 種であった。これらの質量数のピーク強度について APAP 投与群と KCZ 併用群で解析したところ、5 種の質量

数 (m/z 313.60 ***, 345.48 **, 347.56 **, 347.62 *, 388.43 *) が有意に変化することが明らかとなった。このように APAP 誘発肝障害モデルのメタボロミクス解析を通して、特異性と共通性を有する新規バイオマーカー候補を特定するに至った。

E. 結論

ヒトへの応用が簡便な、尿などの非侵襲試料を用いた新規メタボロミクス高感度安全性予測系の確立を目的として、薬物性肝障害モデルにおける尿および生体成分の質量分析計による解析を実施した。その結果、既存の肝障害マーカーと質量スペクトルの相関性を利用して、バイオマーカーを探索する手法を開発し、さらに併用薬による薬物性代謝物のパターン変化についても網羅的に捕らえられることが明らかとなった。今後は、今回抽出されたバイオマーカー候補の構造を解析し、障害部位における内因性の代謝変化と結びつけることで、これらの候補が、肝障害バイオマーカーと成り得るかを検証し、高感度安全性予測系の開発につなげていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

矢本 敬、真鍋 淳：医薬品開発における毒性評価のバイオマーカー：ヒューマンサイエンス、19(2)、22-26、2008

2. 学会発表

Yosuke Ando, Shigehito Takeshita, Katsuyoshi Shibata, Kazunori Fujimoto, Sunao Manabe, Takashi Yamoto: Metabonomic analysis on urine metabolites related to hepatotoxicity in the rat treated with acetaminophen: 44th congress of the European societies of toxicology, Amsterdam, The Netherlands, 7-10 October, 2007

Takashi Yamoto, Yusuke Ando, Naoki Kiyosawa, Sunao Manabe: Application of metabonomics in development of pharmaceuticals: Research trends in metabonomics. The convention of the Korean society of applied pharmacology, Seoul, Korea, 15 November, 2007

Table 1 アセトアミノフェン・アンドロスタノール併用試験の血液化学および病理組織学的検査

Dose	Sample No.	ALT (U/L)	AST (U/L)	T.BIL (mg/dL)	Histopathology Liver
Androstanol 0mg/kg	01M01	3600	8500	0.13	+
	01M02	3700	7900	0.09	++
	01M03	359	687	0.05	±
	01M04	295	647	0.06	±
	01M05	1049	2900	0.07	+
	Mean	1801	4127	0.08	
	S.D.	1744	3934	0.03	
	02M01	128	237	0.04	±
	02M02	351	901	0.00	±
	02M03	137	421	0.05	±
APAP 800mg/kg	02M04	254	693	0.06	±
	02M05	6100	8500	0.11	+
	Mean	1394	2150	0.05	
	S.D.	2632	3559	0.04	
	03M01	50	113	0.04	-
	03M02	61	122	0.00	-
	03M03	43	98	0.04	-
	03M04	38	87	0.03	-
	03M05	1101	3800	0.11	+
	Mean	259	844	0.04	
S.D.	471	1653	0.04		
Androstanol 200mg/kg					

Table 2 アセトアミノフェン・アンドロスタンール併用時のアセトアミノフェン代謝物のピーク強度比と logALT

m/z	Correlation vs logALT		Peak Intensity			
	Compound	r	APAP	APAP+AND 100	APAP+AND 200	
150.25	APAP	-0.126	7171 ± 1286	9177 ± 1135 *	7769 ± 141	
230.25	APAP-S	-0.317	236820 ± 37214	262580 ± 20137	317380 ± 85318	
311.31	APAP-NAC	-0.160	14234 ± 5086	25530 ± 2311 **	26498 ± 6513 **	
326.33	APAP-G	0.046	26460 ± 8958	38374 ± 7600	37770 ± 9623	
logALT			3.39 ± 0.55	2.94 ± 0.60	2.33 ± 0.70 *	

*, p<0.05; **, p<0.01 vs. APAP
n=5, mean ± S.D.

Table 3 アセトアミノフェン・アンドロスタンール併用時の負イオンMSスペクトルにおける肝障害マーカー候補のピーク強度比

m/z	Correlation vs logALT		Peak Intensity			
	r ²	r	APAP	APAP+AND 100	APAP+AND 200	
428.23	0.792	-0.890	279 ± 49	392 ± 90	425 ± 104 *	
466.55	0.745	-0.863	98 ± 24	169 ± 51	227 ± 79 *	
213.34	0.743	-0.862	2303 ± 164	2662 ± 224	2904 ± 312 **	
445.69	0.735	-0.858	99 ± 39	128 ± 38	199 ± 29 **	
274.68	0.730	-0.854	102 ± 55	165 ± 31	209 ± 42 **	
213.27	0.722	-0.850	2460 ± 333	2840 ± 218	2994 ± 409 *	

*, p<0.05; **, p<0.01 vs. APAP
n=5, mean ± S.D.

Table 4 アセトアミノフェン・アンドロスタンール併用時の陽イオンMSスペクトルにおける肝障害マーカー候補のピーク強度比

m/z	Correlation vs logALT		Peak Intensity			
	r ²	r	APAP	APAP+AND 100	APAP+AND 200	
389.65	0.812	0.901	1006 ± 114	853 ± 121	765 ± 163 *	
389.53	0.705	0.840	1742 ± 183	1517 ± 258	1321 ± 273 *	
347.56	0.639	0.800	602 ± 54	450 ± 53 **	368 ± 90 ***	
347.63	0.625	0.791	441 ± 81	345 ± 39 *	314 ± 52 *	
306.79	0.619	0.787	130 ± 31	96 ± 28	65 ± 18 **	
336.51	0.602	0.776	806 ± 101	682 ± 112	466 ± 104 ***	

*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001, vs. APAP
n=5, mean ± S.D.

Table 5 アセトアミノフェン・ケトコナゾール併用試験の血液化学および病理組織学的検査

Dose	Sample No.	ALT (U/L)	AST (U/L)	T.BIL (mg/dL)	Histopathology Liver	
APAP 800mg/kg	Ketoconazole 0mg/kg	01M01	7000	13300	0.17	+
		01M02	3400	5500	0.07	+
		01M03	4400	8400	0.16	+
		01M04	1652	2000	0.08	+
		01M05	2500	4100	0.09	+
	Mean	3790	6660	0.11		
	S.D.	2085	4380	0.05		
	Ketoconazole 100mg/kg	02M01	579	865	0.04	±
		02M02	119	200	0.03	+
		02M03	67	187	0.02	-
02M04		2800	4300	0.07	++	
02M05		115	166	0.04	-	
Mean	736**	1144*	0.04**			
S.D.	1172	1700	0.02			

*, p<0.05; **, p<0.01

Table 6 アセトアミノフェン・ケトコナゾール併用時のアセトアミノフェン代謝物のピーク強度比と log μ

m/z	Compound	Peak Intensity			
		APAP		APAP+KCZ	
150.30	APAP	8795	± 2567	8967	± 4208
230.29	APAP-S	292480	± 52019	394800	± 21529 **
311.40	APAP-NAC	27442	± 1584	32304	± 5832
326.30	APAP-G	42298	± 6475	47956	± 20928
logALT		3.74	± 0.31	2.67	± 0.61 **

** $p < 0.01$ vs. APA
n=5, mean \pm S.D.

Table 7 アセトアミノフェン・ケトコナゾール併用時の肝障害マーカー候補のピーク強度比

m/z [#]	Experiment	Ion mode	Peak Intensity			
			APAP		APAP+KCZ	
196.08	2005	Negative	4995	± 1278	4830	± 2193
213.25	2007	Negative	3047	± 279	3470	± 568
213.31	2007	Negative	3112	± 355	3298	± 564
274.68	2007	Negative	105	± 39	97	± 53
409.56	2005	Negative	1507	± 144	1543	± 160
424.40	2005	Negative	2107	± 396	2253	± 1451
428.23	2007	Negative	336	± 51	361	± 106
445.71	2007	Negative	254	± 41	265	± 67
466.53	2007	Negative	278	± 59	347	± 99
220.16	2006	Positive	510	± 177	590	± 119
270.09	2006	Positive	4049	± 1490	3321	± 565
306.81	2007	Positive	72	± 25	65	± 24
313.60	2005	Positive	5450	± 590	3080	± 202 ***
336.49	2007	Positive	806	± 101	682	± 112
345.48	2005	Positive	7898	± 1478	4492	± 705 **
347.56	2007	Positive	602	± 54	450	± 53 **
347.62	2007	Positive	441	± 81	345	± 39 *
388.43	2005	Positive	7708	± 1407	5897	± 786 *
389.50	2007	Positive	1861	± 268	1630	± 154
389.69	2007	Positive	1006	± 114	853	± 121

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, vs. APAP, n=5, mean \pm S.D.

#, 測定した質量数が一致しなかった場合は最も近い値を選択した

Experiment 2005, APAP 用量反応性試験およびフェノバルビタール併用試験

Experiment 2006, APAP 用量反応性試験 (UPLC/ToF MS法)

Experiment 2007, APAP・AND併用試験

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高度化試薬の開発
ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

分担研究者：宮田直樹

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授

研究要旨

メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発研究では、LC/MS/MS や MALDI TOF/TOF-MS/MS などのソフトイオン化質量分析に利用可能なペプチド誘導体化試薬の開発を行い、昨年度までに、ペプチドのアミノ基にフラウレン構造を温和な条件で導入する試薬を開発しこの誘導体化試薬がペプチド類のソフトイオン化分析に有用であること、同じくペプチドのアミノ基に重水素化したピリジン環を導入する試薬を開発しリン酸化ペプチドを含むペプチド類のアミノ酸配列解析や相対的定量に利用できることを明らかにした。

今年度は、もう一つの研究課題である化学物質の構造修飾が毒性発現に及ぼす影響の解析について、活性酸素消去作用を持ち脳梗塞急性期治療薬として認可されているエダラボンをモデル化合物として選び研究を行った。エダラボンの副作用として知られている腎毒性を軽減する目的で、脂溶性/水溶性を制御する種々の置換基を導入したピラゾロン誘導体を合成し、活性酸素消去能と構造との相関を調べた。その結果、4位にピリジル基を導入したピラゾロン誘導体が、エダラボンに優るすぐれた活性酸素消去能を有していることが明らかになり、構造修飾により毒性が軽減される可能性が示された。

研究協力者

中川秀彦 名古屋市立大学大学院
薬学研究科准教授
鈴木孝禎 名古屋市立大学大学院
薬学研究科助教
大山 亮 名古屋市立大学大学院
薬学研究科博士前期課程院生

A. まえがき

分担研究者宮田は、本研究事業「非侵襲試料を用いた新規高感度安全性予測系の開発」の分担研究課題「メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発」および「メタボロミクス・プロテオミクス解析情報を利用した化学物質の毒性軽減構造修飾研究」を担当している。

メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発研究では、LC/MS/MS や MALDI TOF/TOF-MS/MS などのソフトイオン化質量分析に利用可能なペプチド誘導体化試薬の開発を行った。昨年度までに、フラレン骨格の物理化学的特性がペプチドのソフトイオン化に有用と考え、ペプチドのアミノ基にフラレンを温和な条件で導入する試薬の設計を行い、フラレン構造を有する活性カルボン酸誘導体の合成を達成した。合成した一連の活性カルボン酸誘導体（アミノ基修飾試薬）を用いてアミノ酸類、ペプチド類の誘導体化反応を行い、定量的に誘導体反応が完結するための条件を確立するとともに、誘導体化試薬を用いてフラレンを導入したペプチド類の TOF-MS 分析を行い、誘導体化が効率良く検出できることを確認した。また、メタボロミクス・プロテオミクスの定量的な解析に有用な試薬として、重水素化体が容易に得られるピリジン環をもつ誘導体化試薬の開発を行った。その結果、今回合成した新規 N 末端誘導体化試薬は、ペプチドとの反応性が良くリン酸化ペプチドの検出や PSD モードによるアミノ酸配列解析を容易にすることができることを見出した。また、別途合成した安定同位体標識体を用いるとその質量差から MS による相対的定量に利用できることが分かった。これらの結果より、今回開発した誘導体化試薬は N 末端修飾試薬としてタンパク質の同定や相対的定量、リン酸化部位の同定に有効であることがわかり、定量的リン酸化プロテオーム解析によく用いられている ICAT

(Isotope coded affinity tag) 法と比べても、これらの N 末端修飾試薬は合成が容易で有用である。また、イオン化効率を向上させる構造をもつためペプチド混合物のままリン酸化ペプチドを検出できる可能性があり、リン酸化ペプチドを精製することなく検出し、同定できることが期待できる。

今年度は、分担研究者宮田のもう一つの分担研究課題である化学物質の構造修飾が毒性発現に及ぼす影響に関する研究成果について報告する。毒性が報告されている化合物としてエダラボン（脳梗塞急性期治療薬、腎毒性）をモデル化合物として選び、脂溶性/水溶性を制御した一連の化合物の合成し、活性酸素消去能を比較し、導入した置換基と酸化還元電位ならびに活性酸素消去能との相関を明らかにした。その結果、ピリジル基を導入したピラゾロン誘導体が、エダラボンに優る優れた活性酸素消去能を有していることが明らかになり、構造修飾により毒性が軽減される可能性が示された。

B. 研究目的

脳梗塞急性期に対する治療は、これまで、その血管内の病態のため、主に血管をターゲットとした抗血小板薬、抗凝固薬、抗トロンビン薬、TXA₂ 合成酵素阻害薬が用いられていた。近年の研究により分子レベルでの脳虚血時における細胞障害（血管内皮細胞障害、神経細胞障害など）のメカニズムが次第に明らかとなり、この脳虚血障害の原因の一つとして、フリーラジカルによる細胞膜の脂質過酸化障害の関与が示唆されていた。脳虚血後

及び再灌流により $\cdot\text{OH}$ などの有害なフリーラジカルが爆発的に発生し、細胞膜のリン脂質中の不飽和脂肪酸が過酸化されて細胞障害を引き起こす。またこの障害は一度開始されると連鎖的に進行し、その悪循環のため、脳浮腫、脳梗塞の進展、各種神経障害の進展を招くとされるため、脂質過酸化障害を抑制し、脳機能保護作用を有するフリーラジカル消去薬の開発が望まれていた。

このような背景があり、エダラボン（ラジカット[®]）は2001年6月に三菱化学医薬事業部（現 三菱ウェルファーマ）より世界初の脳保護薬ラジカルスカベンジャー（消去剤）として発売が開始された。エダラボンはフリーラジカル消去作用による抗脂質過酸化効果、脳浮腫抑制作用、神経組織傷害抑制作用、神経脱落症状改善作用を有し、また従来 of 血栓症対策の治療薬とは全く異なる脳保護薬というメカニズムを持ち、他剤との併用療法など治療法選択肢の拡大が期待された。

エダラボンのラジカル消去メカニズムを **Figure 1** に示した。エダラボンは3つの互変異性体が存在するが、生理的条件下においてその約50%がエダラボンアニオンとして存在し、このエダラボンアニオンが虚血時、または再灌流時に爆発的に産生するフリーラジカルに対し一電子供与し各種フリーラジカルを無害なアニオンに変換することで抗酸化活性を示す。この時生じたエダラボン由来ラジカルは共鳴安定化により安定化されているため、病巣内に存在している他の活性酸素種と比べその酸化力は極めて弱い。このことは B3LYP/6-31G を用いた分子科学

計算による反応解析が報告されている。エダラボンラジカルは不対電子を非局在化することによって安定化しており、そのスピン密度は2位窒素原子、4位炭素原子、5位炭素原子に結合している酸素原子において高いとされているが $\cdot\text{OH}$ や $\text{LOO}\cdot$ などの他のラジカル活性種よりも低く、また SOMO レベルが高いことからその反応性ははるかに低いことが考えられている。最終的にエダラボンラジカルの分解物としてラジカルとは無関係な OPB に加水分解される。

本研究では、活性酸素消去能を持つエダラボンに長鎖アルキル基を含む種々の置換基を導入し、脂溶性/水溶性を制御した新規抗酸化化合物を合成した。また、合成した化合物の活性酸素消去能を評価し、構造修飾による毒性軽減の可能性を調べた。

C. 研究方法と結果

エダラボンの基本骨格であるピラゾロン環の1位、3位、4位に様々な機能性官能基を導入したエダラボン誘導体 (**Figure 2**) を合成し、置換位置、電子効果により、酸化電位やヒドロキシルラジカル消去能に対してどのような影響を及ぼすかを検討することで、酸化電位と抗酸化活性の関係を調べた。

また、エダラボン骨格の高い抗酸化活性を生かしつつ脂溶性/水溶性を付与する目的で、長鎖アルキル基や四級アミノ基を有する新規エダラボン誘導体を合成した (**Figure 3, 4**)。

1. 置換基を変えたエダラボン誘導体の合成

一般的にピラゾロン環は、 β -ケトエステルとヒドラジンをエタノール、または酢酸中で還流することにより閉環し合成できる。1位の電子効果を検討するために phenyl 基に置換基を導入した **1, 2** 及び、phenyl 基の必要性を検討するために cyclohexyl 基、2-pyridinyl 基を導入した **3, 4** は、 β -ケトエステル **32** と一当量の対応するヒドラジンをエタノールまたは酢酸中で還流することで合成した (Scheme 1)。

化合物 **5, 6, 7, 8** は、前述した方法を用いて、Phenylhydrazine **33** と一当量の対応する β -ケトエステルとエタノールまたは酢酸中で還流し閉環させることにより合成した (Scheme 2)。

化合物 **9, 10** は、氷冷下においてピリジン中で懸濁させたアミン誘導体 **34** に、対応する酸クロライドを滴下し加熱することで合成した。**11** は、**10** に Cyclopentylamine を加えキシレン中でアミン交換反応させることで合成した (Scheme 3)。

また、マロン酸モノエステルのカリウム塩、塩化マグネシウム、トリエチルアミンの懸濁液に氷冷下、酸クロライド **35** を滴下し、0.5h 後に 2N HCl を加え脱炭酸させることで β -ケトエステル **36** に変換し、次いで 2-1-1 で前述した方法を用いて閉環させることで **12** を合成した。また、同様な方法を用いて **13** を合成した (Scheme 4)。

化合物 **14** は、NaOEt 存在下、 β -ケトエステル **32** に Isobutyl iodide を滴下することで置換基を導入し、次いで 2-1-1 で前述した方法を用いて閉環させることで

合成した。また、**13** は、塩基として NaH、求電子剤に無水酢酸を用いて同様な方法で合成した。**16** は、ニトリル誘導体 **42** に LDA 存在下、無水酢酸を加えアセチル基を導入しエタノール中でアセチルクロライド、濃塩酸を加えることで β -ケトエステルに変換し、同様にして閉環することで合成した (Scheme 5)。

化合物 **17** は、エダラボンに水酸化カルシウム存在下、ベンゾイルクロライドを氷冷下において滴下し、同様に還流し閉環することで合成した (Scheme 6)。

2. 均一水系における酸化電位の測定

Cyclic Voltammetry (CV) 測定では電極の電位を連続的に変化させていき、ある定まった電位より正になってはじめて、溶液中のイオンや分子が酸化される。この電位は化合物固有の値であり酸化されやすさを比べる際に一つの指標となる。つまり、酸化電位の値が小さいほど酸化されやすい。これはエダラボンのメカニズムを考慮すると、一電子を放出するときの目安となる。実験操作が簡便で、電気化学測定法の代表的な方法としてよく用いられている。そこで CV 法を用いて合成したエダラボン誘導体の酸化電位を均一系において測定した。

エダラボン誘導体を 1N NaOH を加えナトリウム塩にして溶かし、1N HCl を加え、液性を pH 7.0-8.0 に戻した。その溶液を 50 mM NaCl を用い希釈し、10 mM のサンプル溶液を調製し、作用電極、カウンター電極に白金電極、参照電極に銀-塩化銀電極を用いて測定を行った。エダラボン誘導体 **5** のサイクリックボルタモグラムは Figure 1 のような曲線を描き、そ

のとき観測される酸化波の極小値の電位を酸化電位 (Oxidation Potential : *Epa*) として記録した。すべてのエダラボン誘導体について酸化電位が測定できたので **Table 1** にその結果を示した。還元波が見られないのは、エダラボン誘導体が一電子酸化された後、素早く分解してしまうためと考えられる。

種々のピラズロン誘導体について酸化電位を測定した結果、ピラズロン環 1 位に置換基を導入した化合物の酸化電位は、置換基の電子効果に関わらずエダラボンと同等かそれよりも高い値を示した。一方、ピラズロン環 3 位、4 位に置換基を導入した化合物では、電子供与性置換基を導入すると酸化電位は低くなり電子求引性置換基を導入すると酸化電位は高くなることが明らかになった。

3. Electron Spin Resonance (ESR) スピントラッピング法を用いた・OH 消去能の評価

酸化電位の測定結果を基に、特徴的な電位を示したエダラボン誘導体のヒドロキシルラジカル消去活性を ESR スピントラッピング法により評価した。ESR 法は常磁性物質を直接測定することができ、均一系、不均一系に関わらずフリーラジカルを検出する有効な測定法である。しかし、生体内で最も反応性が高く、危険な活性種であるヒドロキシルラジカルのように極めて寿命が短く、ほぼ拡散律速に近い速さで反応が起こるような場合は検出が困難になる。その解決法として一般的に用いられているのがスピントラッピング法である。ラジカルが短寿命である場合や ESR 信号がブロードであるため直

接観測できない場合に、適当なスピントラップ剤と反応させ安定な誘導体ラジカルへと変換することでラジカルの検出を可能にする。

本研究では、ヒドロキシルラジカルを検出するスピントラップ剤として 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide

(DMPO) を用いた。DMPO は水溶性が高く、ヒドロキシルラジカルと反応して生じるラジカル誘導体 DMPO-OH が長寿命である。また DMPO-OH は窒素核と水素核による超微細分裂 (hyperfine splitting) が偶然等しく (窒素核と水素核の超微細分裂定数が等しい)、1 : 2 : 2 : 1 の比の特徴的な 4 本線のスペクトルを示す。また、一定量のヒドロキシルラジカルの生成を維持するために過酸化水素 (H_2O_2) に UV を照射する方法を用いた (**Scheme 7**)。

ESR 測定では、スペクトルの両端に検出される標準物質である Mn のピークに対する各化合物の DMPO-OH adduct のシグナル強度の比を計算し control の比を 1 としたときの割合 (%control) を示した。

その結果、**Figure 2a, 2b** に示したように、すべてのエダラボン誘導体において DMPO-OH adduct のスペクトルの減少が観測され、ヒドロキシルラジカル消去活性を持つことを確認した (各サンプル最終濃度 $250 \mu M$)。そこで、さらに各サンプルの濃度を変化させ、各化合物の IC_{50} 値を検討した (**Table 2**)。この結果から、1 位に 2-ピリジル基を導入したエダラボン誘導体 **4** ($IC_{50} = 18 \mu M$) が唯一、リード化合物であるエダラボン ($IC_{50} = 250 \mu M$) をはるかに超える強い抗酸化活性を示した。酸化電位の値が低い誘導体が、強い

抗酸化活性をもつことが期待されたが、4 以外の誘導体は酸化電位の値に関わらずエダラポンを超える活性は示さなかった。

4. 脂溶性エダラポン誘導体の合成

様々なエダラポン誘導体を合成し置換基効果を検討したことで、均一系におけるヒドロキシルラジカル消去活性には適度に低い酸化電位をもつこととエノレート型の存在比が重要であるという知見を見いだした。また置換基の導入位置により酸化電位が大きく変化するが、1 位への置換基の導入はあまり影響がないことを明らかにした。そこで、エダラポン骨格の高い消去活性を生かしつつ、脂溶性を高めた新規エダラポン誘導体の開発を検討した。具体的には、ピラズロン環の 1 位、3 位、4 位に長鎖アルキル基を導入した脂溶性誘導体の合成を行った。

重要な中間体であるヒドラジン塩酸塩 **48** の合成は、**Scheme 8** の方法で行った。*p*-ハロニトロベンゼン **45** と 1-ドデシンの菌頭カップリングにより長鎖アルキル基を導入した **46** に変換した後、接触還元することでニトロ基とアルキン部を還元しアミン **47** とした。次に 6N HCl 中に懸濁させた **47** に対し H₂O に溶かした亜硝酸ナトリウムを滴下した後、0.5h 氷冷下攪拌し、次いで塩化スズを加え還元することでヒドラジン塩酸塩 **48** を合成した。

1 位に長鎖アルキル基を導入した誘導体 **18**, **19**, **20**, **21**, **22** は、ピラズロン環合成の一般法を用い、**Scheme 8** で得た中間体 **48** と対応する β -ケトエステルを酢酸中で還流し閉環させることで合成した

(**Scheme 9**)。

3 位に長鎖アルキル基を導入した誘導体 **23** は、**Scheme 10** に示した方法を用いて合成した。アルデヒド **49** を亜塩素酸で温和な条件で酸化することでカルボン酸 **50** に導き、オギザリクロライドにより酸クロライドに変換した後、ピラズロン骨格をもつアミン **34** に氷冷下において滴下しアシル化することで合成した。

4 位に長鎖アルキル基を導入した誘導体 **24**, **25**, **26**, **27**, **28** の重要な中間体となる長鎖アルキル基を導入した **52** は、 β -ケトエステル **32** に NaOEt 存在下アルキルプロマイド **51** を滴下し反応させることで合成した (**Scheme 11**)。

24, **25**, **26**, **27**, **28** は、ピラズロン環合成の一般法を用い、**Scheme 11** で得た中間体 **52** 応するヒドラジンを酢酸中で還流し閉環させることで合成した (**Scheme 12**)。

5. 水溶性エダラポン誘導体の合成

脂溶性エダラポン誘導体と水溶性エダラポンの比較を行うため、エダラポンの水溶性を一層高める目的でカチオン性置換基をもつ **29** の合成を行った。化合物 **29** は、マロン酸モノエステルのカリウム塩、塩化マグネシウム、トリエチルアミンの懸濁液に氷冷下、酸クロライドの塩 **53** をゆっくりと加え、0.5h 後に 2N HCl で脱炭酸させ β -ケトエステル **34** に変換し、続いてピラズロン環合成の一般法を用いて閉環させることで **56** を得た。これに過剰量の MeI を加え加熱することで水溶性エダラポン誘導体 **29** を合成した。 (**Scheme 13**)

6. 不均一系における脂溶性エダラポン誘導体の活性評価

リポソームを用いて長鎖アルキル基を導入した脂溶性エダラボン誘導体の脂質膜中での抗酸化活性を検討した。本研究では、リポソームとして大型一枚膜リポソーム (LUV : Large Unilamellar Vesicle) を利用した。LUV の大きさは直径が 100-1000 μM で、物質封入率が高く本研究目的にかなっている。Phosphatidylcholine (PC): Phosphatidylserine (PS) = 6 : 4 からなるリポソーム (LUV) は、逆相蒸発法 (Reverse-Phase Evaporation) 法により調製した。逆相蒸発法はリポソームの一般的な調製法の一つで、生成するリポソームの保持容量が大きいので様々な物質の封入に適しており、また粒径が比較的均一である特徴を持つ。

合成した脂溶性エダラボン誘導体を脂質の総物質量の 15%モル濃度 含むリポソーム (含まれる化合物物質量は 1.13×10^{-3} mmol) を前述した逆相蒸発法により調製し、10 分間 Ar で脱気した後、CV 法により酸化電位を測定した (リポソームの水相は 50 mM NaCl 溶液を用いた)。作用電極、カウンター電極に白金電極、参照電極に銀-塩化銀電極を用いて測定を行った。

脂溶性エダラボン誘導体 **18** のリポソーム中におけるサイクリックボルタモグラムは **Figure 4** のような曲線を描き、そのとき観測される酸化波の極小値の電位を酸化電位 (Oxidation Potential : *Epa*) として記録した。合成したすべての脂溶性エダラボン誘導体と対照物質として用いた γ -tocopherol について酸化電位の測定を行った。**18**, **23**, **24** についてはピ

ークが検出されたので **Table 3** にその結果を示した。しかし γ -tocopherol を含め他の誘導体についてはピークを検出することができず酸化電位を求めることはできなかった。

Table 3 の結果をみると、ピラズロン環 1 位、3 位、4 位に電子供与基である長鎖アルキル基を導入した化合物の酸化電位は、1 位置換体がわずかに低い値を示しリポソーム存在下でのエダラボンの酸化電位に近い値を示した。均一系では 3 位、4 位への電子供与基の導入により酸化電位は大きく変化し低くなることを示したが、不均一系ではこれと異なる結果となった。

7. ESR スピントラッピング法を用いた不均一系における $\cdot\text{OH}$ 除去能の評価

リポソーム膜中での抗酸化活性を明らかにするため ESR スピントラッピング法を用いて合成した脂溶性エダラボン誘導体のリポソーム中における $\cdot\text{OH}$ 除去能を検討し、各置換位置における抗酸化活性への影響を調査した。

各脂溶性エダラボン誘導体を脂質の総物質量の 15%モル濃度含むリポソーム (含まれる化合物物質量は 1.13×10^{-3} mmol) を前述した逆相蒸発法により調製し $\cdot\text{OH}$ 除去能の評価を行った。また、 γ -tocopherol、無置換のエダラボン、水溶性抗酸化剤 **29** などと活性の比較することで、脂溶性を付与しリポソームへの局在性を持たせたことの効果を検討した。

Figure 5a, 5b にこの結果を示す。

スペクトルの両端に検出される標準物質である Mn のピークに対する各化合物の DMPO- OH adduct のシグナル強度の比を計算し control の比を 1 としたときの割合