

反応性代謝物の曝露量に基づいた  
肝障害リスク予測に関する研究

2024 年

角谷 信至

## 目次

略語及び記号一覧 .....	1
緒論 .....	3
第一章 第一相代謝反応による反応性代謝物の定量的評価法の新規構築 .....	6
第一節 F-NMR を用いた含フッ素化合物の共有結合量評価 .....	7
第一項 F-NMR による定量性の確認 .....	7
第二項 F-NMR を用いた flutamide の共有結合量評価 .....	9
第二節 RI 標識トラップ剤を用いた定量的トラッピングアッセイ評価 .....	11
第一項 固相抽出法を用いたサンプル前処理検討 .....	11
第二項 [ $^{14}\text{C}$ ]KCN および [ $^{35}\text{S}$ ]Cys を用いた定量的トラッピングアッセイ評価 .....	15
第三節 考察 .....	20
第二章 第二相代謝反応による反応性代謝物の定量的評価法の新規構築 .....	23
第一節 アシル CoA 抱合体のトラッピング試薬の探索 .....	24
第二節 アシル CoA 抱合体トラッピングアッセイの構築 .....	27
第三節 [ $^{35}\text{S}$ ]Cys トラッピングアッセイおよび非標識 Cys トラッピングアッセイのアダクト生成量の比較 .....	29
第四節 考察 .....	32
第三章 反応性代謝物曝露量に基づく肝障害リスク予測 .....	35
第一節 共有結合量と曝露による肝障害リスク予測 .....	35
第二節 トラッピングアッセイを用いた肝障害リスク予測 .....	42
第三節 考察 .....	53
結論 .....	56

謝辞.....	58
実験の部.....	59
参考文献.....	69
論文目録.....	82

## 略語及び記号一覧

AO	aldehyde oxidase
AUC	area under the curve
CES	carboxylesterase
CoA	coenzyme A
CYP	cytochrome P450
CVB	covalent binding
DTT	dithiothreitol
DMSO	dimethyl sulfoxide
FA	formic acid
FMO	flavin-containing monooxygenase
GSH	glutathione
HPLC	high performance liquid chromatography
ICH	international council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use
IVIVE	in vitro-in vivo extrapolation
LC	liquid chromatography
LMs	liver microsomes
MeCN	acetonitrile
MS	mass spectrometer
MS/MS	tandem mass spectrometer
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ODS	octadecylsilyl

PDA	photodiode array
PK	pharmacokinetics
RI	radioisotope
RM	reactive metabolite
UDP	uridine-5'-diphosphate
UGT	UDP-glucuronosyl transferase
UPLC	ultra performance liquid chromatography
UV	ultraviolet

## 緒論

医薬品は疾病治療や症状緩和を目的としてヒトに適用され有用な効果をもたらすが生体にとっては異物であり、その多くは代謝を受けて体外へ排出される。ヒトにおける薬物代謝は主に肝臓で行われ、cytochrome P450 (CYP)による酸化や還元等の第一相代謝反応や UDP-glucuronosyl transferase (UGT)によるグルクロン酸抱合等の第二相代謝反応によって、より親水性が高くなるよう構造変化を受ける<sup>1</sup>。一般に親水性を高められた代謝物の薬理活性や毒性ポテンシャルは親薬物と比較して減弱する傾向にある<sup>2</sup>が、代謝反応によって親化合物よりもむしろ反応性の高い化学種が生じることも知られている。そのような代謝物は反応性代謝物と呼ばれ、毒性発現の要因と考えられている<sup>3</sup>。糖尿病薬として開発され日本国内でも処方されたトログリタゾンは重篤な肝障害により販売が中止されたが、その原因として反応性代謝物の関与が示唆されている<sup>4,5</sup>。反応性代謝物は近傍に存在する代謝酵素等のタンパクに非特異的に共有結合し、結合により生じた異常なタンパクが免疫応答することで毒性が発現すると考えられている（ハプテン仮説）<sup>6,7</sup>。反応性代謝物による毒性は医薬品の販売中止や開発中断にもつながる非常に深刻な問題であるにも関わらず、動物を用いた毒性学的安全性評価では検出することはできず、更にヒトにおいても1万人に1人等の低い割合で特異体質性薬物毒性として認められるため、医薬品開発試験の過程でそのリスクを予見することは難しい<sup>8</sup>。そこで、ヒト由来試料を用いた *in vitro* 代謝試験におけるタンパクへの結合量を指標に反応性代謝物を生成しない、あるいはその生成量が少ない医薬候補品を見出す取り組みが行われている<sup>9</sup>。

医薬品創出プロセスは探索段階と開発段階に大別され、探索段階では標的分子に対する薬理活性、*in vitro* 代謝安定性、膜透過性、溶解性等のスクリーニング評

価が行われ数多くの化合物が創出される。一方で開発段階では、コストをかけた精査が少数の候補化合物に対して行われる。開発段階では、動物における毒性試験および放射性同位元素(RI)標識体を用いた薬物動態試験が行われた後、健常人を対象とした安全性評価が行われる。日本国内 2016～2020 年のデータによると、製薬会社において探索段階で合成された新規化合物のうち、開発段階へと進められる確率は 2920 分の 1、最終的に上市される確率は 21,963 分の 1 であると報告されているが<sup>10</sup>、RI 標識体を用いて反応性代謝物生成の有無が確認されるのは、上述の開発段階へ進んだ薬物あるいは候補品等の限られた化合物のみである。しかし、反応性代謝物の生成量は特異体質性肝障害リスクに関係があると報告されており<sup>11</sup>、探索段階から反応性代謝物生成を定量的に評価し、そのリスクを回避した化合物を選出することが重要であると考えられる。そこで、本研究では RI 標識された化合物が入手できない探索段階においても反応性代謝物生成を定量的に評価できる評価系の確立、および、反応性代謝物生成ポテンシャルから精度よくヒトでの毒性リスクを評価できる予測法の確立を目的として検討を行った。

第一章ではヒト肝ミクロソームを用い、第一相代謝反応により生成する反応性代謝物の定量的評価法を検討した。1991～2011 年の間に上市された新薬のうち、フッ素原子を有する化合物は 1 割以上を占め<sup>12</sup>、医薬品構造へのフッ素導入の有用性<sup>13,14</sup>から今後も増えたと予想される。フッ素原子はトレーサーとして F-NMR で定量することが可能であり、含フッ素医薬品 flutamide を用いた検討により放射性同位元素標識体を使用せずに共有結合量の評価が可能であることを新規に示した。またフッ素原子を有さない薬物に対する評価法として、定量的トラッピングアッセイを構築し、その反応性を定量的に評価できることを示した。

第二章では、カルボン酸の第二相代謝反応により生成するアシル CoA 抱合体の反応性を定量的に評価する方法を検討した。構造中にカルボン酸を有する

NSAIDs 等の薬物から生じるアシル CoA 抱合体は非常に反応性が高く、ミクロソーム等のタンパクへの共有結合性を示す<sup>15,16</sup>ことが知られているものの、その反応性を評価する方法は報告されていない。そこで、適切なトラップ剤を探索し、システインがアシル CoA 抱合体と安定なアダクトを形成することを明らかにし、更にその反応性の定量的な評価系を構築した。

第三章では、臨床における反応性代謝物による肝障害リスク予測法を検討した。第一相代謝反応および第二相代謝反応により生じた反応性代謝物データ（共有結合量またはシステインアダクト生成量）と親化合物の臨床 PK パラメーター（投与量・クリアランス、または血漿中曝露）から、ヒト生体内で生成する反応性代謝物量を推定することで、精度よく特異体質性肝障害リスクが予測できることを示した。

本研究では、放射性同位元素標識された化合物を用いることなく反応性代謝物を定量的に評価できる評価法を構築した。更に親化合物の曝露量を考慮することで良好に肝障害リスクを予測できることを示した。医薬品探索段階からこれらの評価を行うことで、安全かつ効率的な医薬品の創出に貢献できると期待される。

以下三章にわたって詳述する。



## 第一章 第一相代謝反応による反応性代謝物の定量的評価法の新規構築

薬物代謝は、酸化・還元・加水分解等の第一相代謝反応と、グルクロン酸抱合・硫酸抱合・アミノ酸抱合等の第二相代謝反応に分類される。2006-2015 年に承認された医薬品のうち、第一相代謝反応による代謝を受ける薬物は 7 割近くを占めており、中でも CYP 代謝によるものは 5 割以上を占める<sup>17</sup>。解熱鎮痛薬 acetaminophen が CYP2E1 による代謝を受けて反応性代謝物を生じることが報告されているように<sup>18</sup>，反応性代謝物に関する報告は第一相代謝反応によるものが多く，反応性代謝物の生成量を示す指標として，しばしばヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験時のミクロソームタンパクへの共有結合量が用いられる<sup>19</sup>。生成した反応性代謝物はタンパクに不可逆的に共有結合するため，結合した薬物を定量するにはトレーサーを使用した評価が不可欠である。医薬品開発過程では<sup>3</sup>Hあるいは<sup>14</sup>Cにより標識した被験物質を用いた評価が行われるが<sup>20,21</sup>，その調達には高額なコストと時間を要する<sup>22</sup>。そこで，探索段階における反応性代謝物生成リスクのスクリーニング法として，グルタチオン(glutathione, GSH)トラッピングアッセイが広く実施されている<sup>23</sup>。

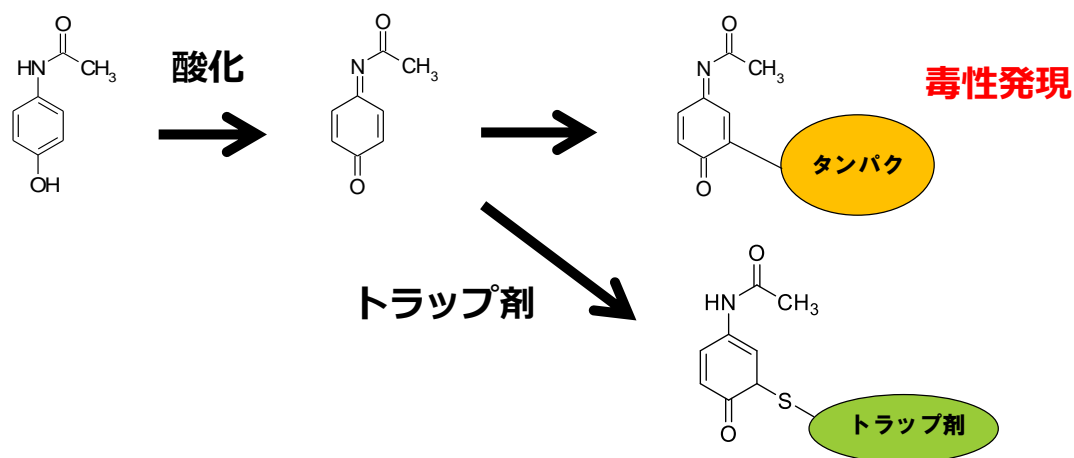


Figure 1. Acetaminophen 反応性代謝物生成とトラッピングアッセイの模式図

GSH 存在下でヒト肝ミクロソーム代謝試験を行うと、生じた反応性代謝物は GSH と安定な結合体を形成するため、理論的には LC/MS 測定により反応性代謝物生成を評価することができる<sup>24</sup> が、生じた様々な GSH 結合体を標品なしに検出しなければならず、LC/MS による GSH トラッピングアッセイでは反応性代謝物の定量的な評価は困難である<sup>25</sup>。しかし、反応性代謝物の生成量は特異体質性肝障害リスクに関係する<sup>11</sup> ため、探索段階においても被験物質の反応性代謝物生成を定量的に評価することは重要であると考えられる。

以上の背景から、第一章では、第一相代謝反応によって生じる反応性代謝物の定量的評価法について検討を行った。医薬品にしばしば使用されるフッ素原子に注目し、フッ素原子を構造中に有する薬物のヒト肝ミクロソームによる反応性代謝物生成を評価するため、新たに F-NMR を利用した定量法を検討した。またフッ素原子を有さない薬物の反応性代謝物生成を評価するためにトラップ剤側が放射性同位元素標識された $[^{14}\text{C}]$ KCN および $[^{35}\text{S}]$ システインを用いた定量的トラッピングアッセイを検討した。

## 第一節 F-NMR を用いた含フッ素化合物の共有結合量評価

### 第一項 F-NMR による定量性の確認

フッ素原子の導入は、その物理化学的な性質から標的タンパクへの親和性向上、炭素-フッ素間の強い結合エネルギーによる代謝安定性向上、分子内水素結合の形成による溶解性改善等の様々な効果を期待し、しばしば医薬品構造に使用される<sup>13,14</sup>。分析面では、フッ素原子は核スピンの  $1/2$  であり、天然の同位体存在比が 100%、生体タンパク質中にフッ素原子が存在しない<sup>26</sup> ため、トレーサーとして使用することができる。そこで、新規に薬物の反応性代謝物による共有結合量を F-NMR を利用して定量することを検討した。

まず F-NMR 測定により得られる定量値の線形性を確認する目的でトリフルオロメチル基を有する flutamide (Figure 2A) について、溶媒には重アセトニトリルを含む重水を用いて標準溶液を段階希釈し定量を行った。内部標準物質には 3,5-bis(trifluoromethyl)phenol (Figure 2B) を使用した。段階希釈した標準溶液中化合物の理論濃度と F-NMR 定量した濃度の比較を行い、その結果を Table 1 に示した。 $\mu\text{M}$  オーダーの低濃度においても、内部標準法から得られた flutamide 濃度の正確度は比較的良好であり、3,5-bis(trifluoromethyl)phenol と flutamide は同等の F-NMR シグナルを示したと考えられた。

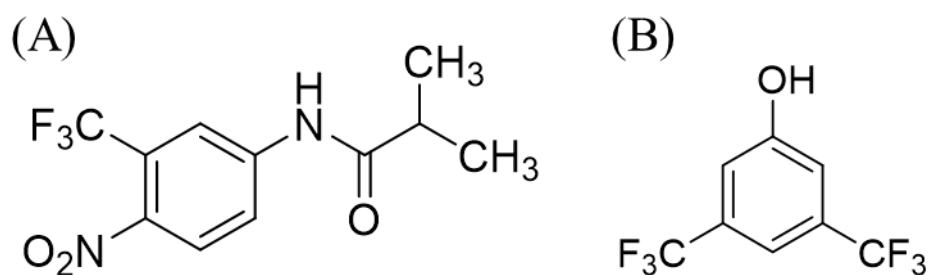


Figure 2. Flutamide (A) および 3,5-bis(trifluoromethyl)phenol (B) の化学構造

Table 1. flutamide の調製濃度と F-NMR による濃度測定結果の比較

理論濃度 ( $\mu\text{M}$ )	測定値 ( $\mu\text{M}$ )	正確度 (%)
2	1.78	89.1
5	5.08	101.7

## 第二項 F-NMR を用いた flutamide の共有結合量評価

前立腺がんの治療薬として用いられる抗アンドロゲン剤 flutamide (Figure 3) はトリフルオロメチル基を有しており、CYP3A および 1A による代謝により反応性代謝物が生成してヒト肝ミクロソームタンパクへ共有結合することが報告されている<sup>27,28</sup>。そこで、flutamide を NADPH 存在下でヒト肝ミクロソームと反応させ、そのタンパク残渣中のフッ素シグナルを F-NMR にて定量することにより、共有結合量を評価した。

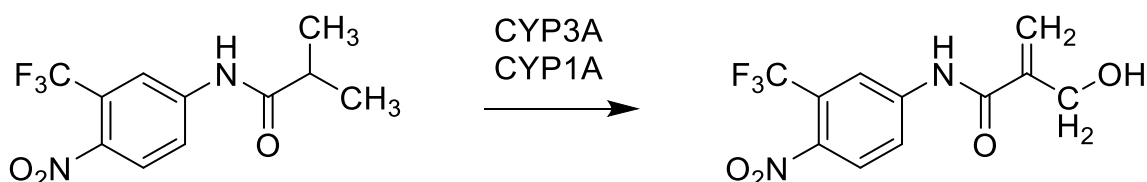


Figure 3. Flutamide およびその反応性代謝物の化学構造

ヒト肝ミクロソームを用いた第一相代謝反応は、共有結合量評価でしばしば報告されているコンベンショナルな条件<sup>29,30</sup>に準じて実施した。対照群には、NADPH 生成系非添加サンプルを用いた。内部標準物質として 3,5-bis(trifluoromethyl)phenol を加えた重水混合液を添加し、F-NMR 測定およびタンパク定量を行った。F-NMR 測定を行った際のスペクトルを Figure 4 に示した。

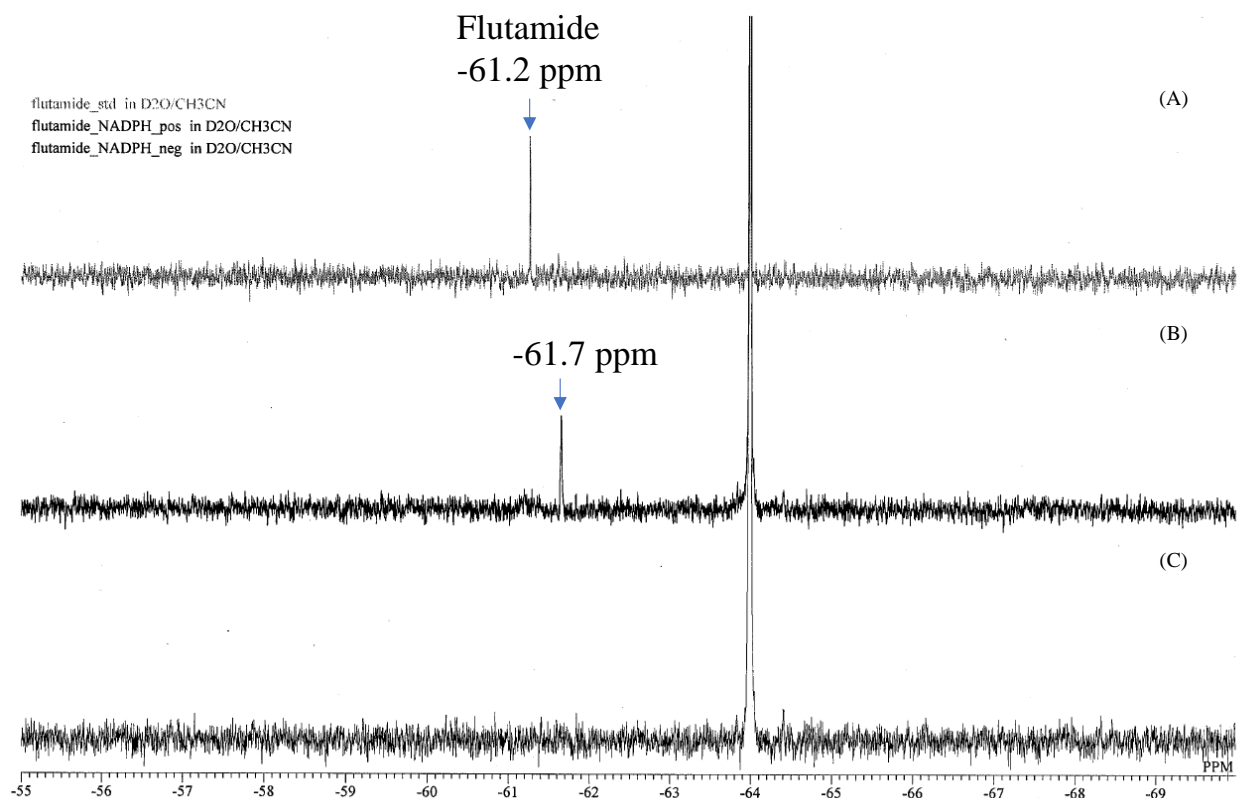


Figure 4. F-NMR スペクトル | flutamide 溶液(A), NADPH 生成系添加群(B), NADPH 生成系非添加群 (対照群) (C)

NADPH 生成系添加群で flutamide 由来ピークが検出された。また溶媒添加したサンプルでの化学シフト -61.2 ppm に対して、NADPH 生成系添加群では -61.7 ppm と異なる化学シフトを示した。得られた NMR スペクトルの面積ピークと濃度既知の内部標準物質のピーク面積との比較から算出した flutamide 由来ピークの濃度、およびタンパク定量値はそれぞれ 2.33  $\mu\text{M}$  および 7.87 mg/mL であったことから、flutamide の肝ミクロソームへの共有結合量は 296 pmol/mg/hr と算出された。RI 標識体を用いた検討による報告値は 477 pmol/mg/hr<sup>31</sup>あるいは 178 pmol/mg/hr<sup>32</sup>であり、同等の値を示したものと考えられた。

本実験結果から、これまで RI 標識体を用いて行われてきていた反応性代謝物による共有結合が F-NMR 定量により評価可能であることが新規に示された。

## 第二節 RI 標識トラップ剤を用いた定量的トラッピングアッセイ評価

### 第一項 固相抽出法を用いたサンプル前処理検討

RI やフッ素原子等のトレーサーを持たない薬物では、タンパクに結合した薬物量を評価することは困難である。そのため、タンパクの代わりに任意のトラップ剤と形成させた結合体を検出することで評価（トラッピングアッセイ）が行われる。代表的な反応性代謝物とそれらを検出することが可能なトラップ剤を Figure 5 に示した。

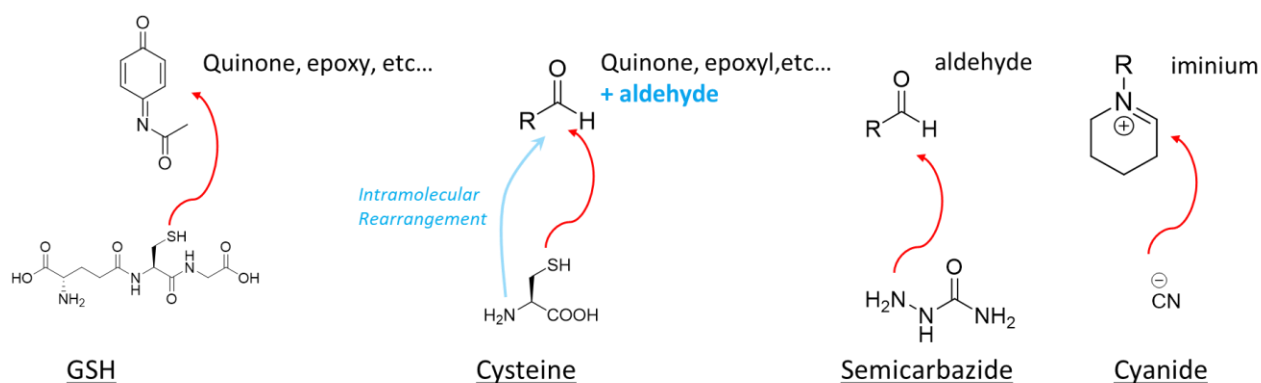


Figure 5. 様々な反応性代謝物とそのトラップ剤

反応性代謝物の化学的性質により適切なトラップ剤は異なり、どのようなトラップ剤が適切かは酸・塩基間での反応の起きやすさを示す HSAB 則<sup>33</sup>により説明される。すなわち、静電的な相互作用が強い酸・塩基 (hard), 分子軌道における相互作用が強い酸・塩基 (soft) の組み合わせが反応しやすいとされている。例え

ばアセトアミノフェンから生じるキノンイミンはsoftな求電子剤であるため, softな求核剤である GSH やシステインのチオール基と反応し, hard な求電子剤であるアルデヒドやイミニウムはhardな求核剤であるアミノ基やセミカルバジド, シアニドと反応することが知られている。clozapine や diclofenac 等の薬物に対して  $[^{35}\text{S}]$ グルタチオンや  $[^{35}\text{S}]$ システイン,  $[^{14}\text{C}]$ KCN を用いたトラッピングアッセイにより定量的に評価した報告がされている<sup>34,35</sup>ものの, 先行報告では Radio-HPLC 分析時の検出感度を上げる目的で被験物質濃度を 50 あるいは 100  $\mu\text{M}$  と非常に高い濃度で実施しており, 反応性代謝物生成量の過小評価が懸念される。そこで, 本検討では共有結合量の評価でしばしば行われる被験物質濃度 10  $\mu\text{M}$  条件で反応性代謝物生成を評価できるトラッピングアッセイの構築を目指した。生成する反応性代謝物を感度良く検出するためにはトラップ剤の濃度を 1 mM<sup>36,37</sup> 等の高濃度にする必要があるが, 未反応のトラップ剤が反応液中に残存し Radio-HPLC 上のノイズとなることが分析上の問題となる。そこで, ノイズを低減させ目的成分のピークを感度よく検出するため, 固相抽出法による前処理を検討した。

親水性および疎水性の官能基を有するポリマーベースの OASIS HLB プレートおよび ODS(オクタデシル)基を有する Sep-Pak tC18 プレート (いずれも Waters 社) を用い, タンパク濃度が 1.0 mg/mL になるように調製したヒト肝ミクロソームに  $[^{14}\text{C}]$ KCN を 1 mM (2.22 GBq/mmol) になるように添加したマトリックスを用いてノイズ除去の可能性について検討を行った。溶出液の放射能を経時的に測定し, 放射能回収率を算出した。結果を Table 2 に示す。

Table 2. OASIS HLB および Sep-Pak tC18 による放射能回収率

OASIS HLBを用いた前処理時の放射能の総回収率					Sep-Pak tC18を用いた前処理時の放射能の総回収率					Sep-Pak tC18を用いた前処理時の放射能の総回収率				
操作	溶媒	Times	溶出液の放射能 (dpm)	添加液に占める割合 (%)	操作	溶媒	Times	溶出液の放射能 (dpm)	添加液に占める割合 (%)	操作	溶媒	Times	溶出液の放射能 (dpm)	添加液に占める割合 (%)
平衡化	H <sub>2</sub> O	--	--	--	平衡化	H <sub>2</sub> O	--	--	--	平衡化	100 mM KPB (pH7.4)	--	--	--
試料添加	反応液	--	11,539,700	39.5	試料添加	反応液	--	23,037,900	78.8	試料添加	反応液	--	18,737,500	64.1
		1	1,441,888	4.93			1	147,013	0.50			1	4,602,140	15.7
		2	243,423	0.83			2	55,822	0.19			2	86,561	0.30
		3	37,059	0.13			3	12,249	0.04			3	26,991	0.09
洗浄	H <sub>2</sub> O	4	15,571	0.05			4	8,003	0.03			4	37,524	0.13
		5	14,288	0.05			5	5,025	0.02		100 mM KPB (pH7.4)	5	11,460	0.04
		6	8,149	0.03		H <sub>2</sub> O	6	4,193	0.01			6	9,550	0.03
		7	7,841	0.03			7	7,323	0.03			7	7,069	0.02
溶出	MeCN		148,473	0.51			8	2,731	0.01			8	6,419	0.02
放射能の総回収率(%)			13,456,391	46.0			9	2,549	0.01			9	4,623	0.02
					洗浄		10	3,382	0.01			10	3,921	0.01
							1	5,932	0.02	洗浄		1	10,085	0.03
							2	3,902	0.01		NaCl水溶液	2	2,829	0.01
							3	3,184	0.01			3	2,627	0.01
						2% MeCN 水溶液	4	2,489	0.01			1	14,668	0.05
							5	1,320	0.00		H <sub>2</sub> O	2	3,488	0.01
							6	2,421	0.01			1	12,426	0.04
							7	2,275	0.01			2	3,703	0.01
							8	1,851	0.01		2% MeCN 水溶液	3	1,661	0.01
							9	2,398	0.01			4	3,842	0.01
溶出	MeCN		53,903	0.18								5	2,244	0.01
放射能の総回収率(%)			23,365,865	79.9						溶出	MeCN		61,331	0.21
										放射能の総回収率(%)			23,591,331	80.7



OASIS HLB による前処理では、放射能の総回収率は 50%未満の低値を示した一方、Sep-Pak tC18 では放射能のおよそ 80%程度が回収できており、反応性代謝物と結合しなかった KCN を効率よく除去しながらも目的成分を溶出できていることが確認された。Sep-Pak tC18 でのコンディショニングおよび洗浄溶媒として水からバッファーや 2%アセトニトリルに変更しても放射能の溶出にほとんど差が認められなかったことから、以降の操作では固相には Sep-Pak tC18 を使用し、コンディショニングおよび洗浄には水を用いた。Sep-Pak tC18 で前処理を行ったサンプルを Radio-HPLC 測定し、得られたクロマトグラムを Figure 6 に示した。前処理を行うことでノイズが劇的に減少しており、KCN を効率よく分離できていることが確認された。

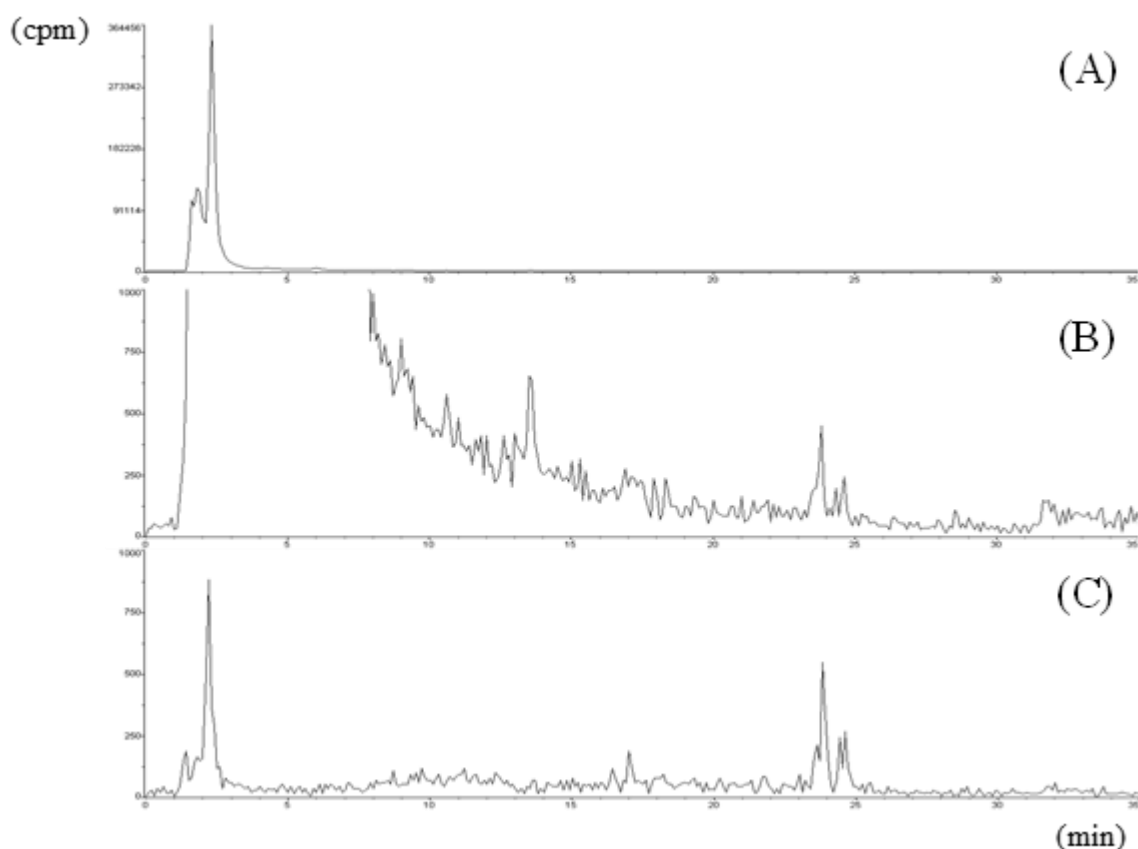


Figure 6. Radio-HPLC クロマトグラム | 未処理サンプル (A),  
未処理サンプルの拡大図 (B) , Sep-Pak tC18 による前処理サンプル (C)

## 第二項<sup>[14C]</sup>KCN および <sup>[35S]</sup>Cys を用いた定量的トラッピングアッセイ評価

前項で構築した固相抽出法を用いて、RI 標識トラップ剤によるトラッピングアッセイ評価を実施した。第一相代謝反応により生成する hard および soft な反応性代謝物のトラップ剤にはそれぞれ<sup>[14C]</sup>KCN および<sup>[35S]</sup>システイン<sup>38</sup>を用いた。<sup>[35S]</sup>システインは<sup>[35S]</sup>GSH よりも安価に入手することができ、また一般的な ODS カラムによる保持も弱い<sup>39</sup>ことから、前項で検討した KCN 除去と同様の手順で未反応のトラップ剤がより除去しやすいと考えられた。被験物質として、それぞれ共有結合性が知られている rimonabant および diclofenac を用いた。なお、rimonabant は環状アミンを有しておりイミニウムを生成することが想定されたため KCN トラッピングアッセイを、diclofenac はキノンイミンを生成することが想定されたためシステイントラッピングアッセイをそれぞれ実施した。

得られた Radio-HPLC クロマトグラムを Figure 7 および Figure 8 に示した。rimonabant の反応性代謝物がシアンアダクトとして、diclofenac の反応性代謝物はシステインアダクトとしてそれぞれ Radio-HPLC 上のピークとして検出された。いずれの薬物においても複数のピークが認められており、トラッピング試薬とのアダクトは結合部位により複数の異性体を生じることが確認された。

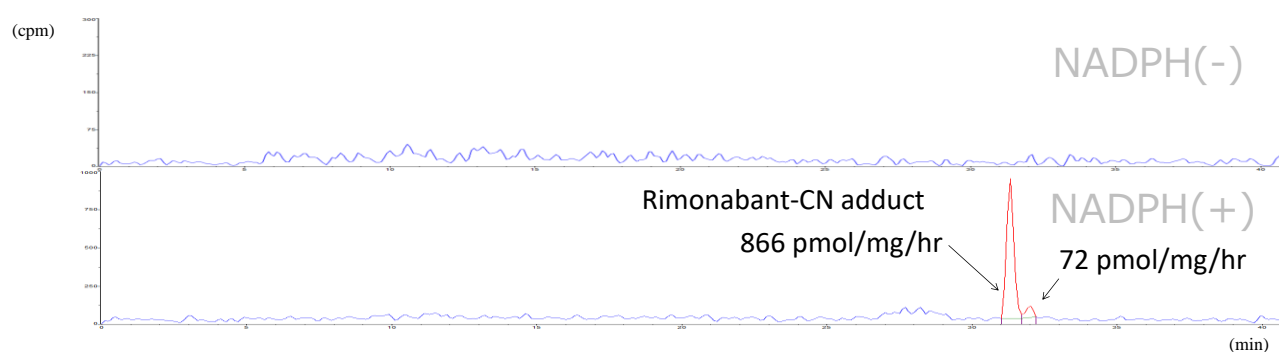


Figure 7. [ $^{14}\text{C}$ ]KCN トラッピングアッセイの Radio-HPLC クロマトグラム

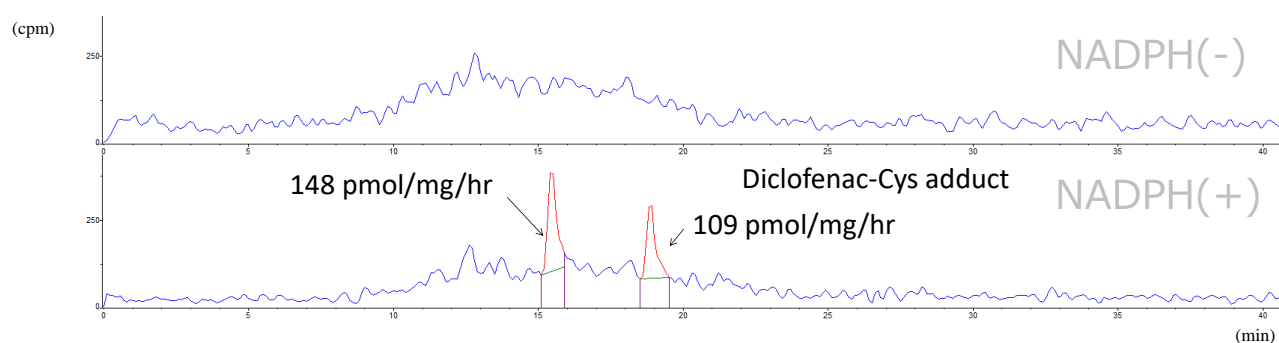


Figure 8. [ $^{35}\text{S}$ ]システイントラッピングアッセイの Radio-HPLC クロマトグラム

[ $^{14}\text{C}$ ]KCN トラッピングアッセイおよび [ $^{35}\text{S}$ ]システイントラッピングアッセイのラジオクロマトグラム上にそれぞれアダクトのピークが検出され、およそ 100 pmol/mg に相当するピークは検出可能と考えられた。更に、得られたアダクトの結合様式を確認する目的で、5 ppm 未満の質量精度で  $m/z$  を取得することができる高分解能 MS を用い、positive mode での Full scan 測定を行った。得られた  $m/z$  から考えられるアダクトの組成式を Table 3 に示した。

Table 3. 薬物と想定されるアダクトの  $m/z$

shift	Chemical composition			$m/z$ (positive)		
	Parent drug	$[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ adduct	$[^{14}\text{C}]\text{CN}$ adduct	Parent drug	$[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ adduct	$[^{14}\text{C}]\text{CN}$ adduct
	--	+Cys+O-2H	-H+CN	--	137.996	26.998
rimonabant	C22H21Cl3N4O	C25H26Cl3N5O3 $^{35}\text{S}$	$^{14}\text{C}$ C22H20Cl3N5O	463.0854	598.0845	488.0805
diclofenac	C14H11Cl2NO2	C17H16Cl2N2O4 $^{35}\text{S}$	$^{14}\text{C}$ C14H10Cl2N2O2	296.0240	431.0231	321.0191

得られた  $m/z$  および結合様式から, rimonabant<sup>40</sup> および diclofenac はそれぞれ Figure 9 に示す結合様式によりトラップ剤とアダクトを形成したと考えられた。

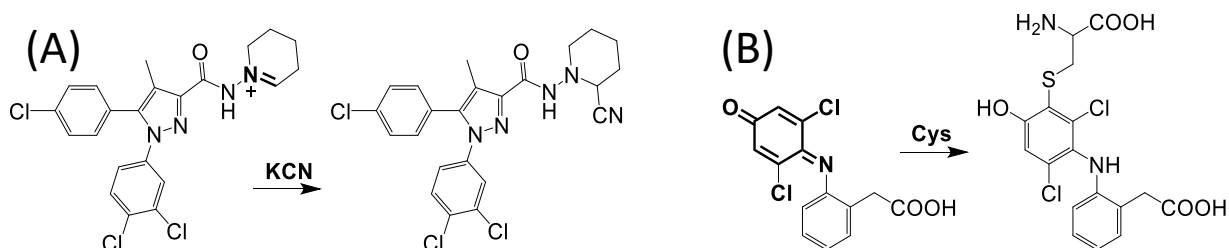


Figure 9. Rimonabant(A)および diclofenac(B)から生じた反応性代謝物とシアンアダクトおよびシステインアダクトの推定構造

続いて, 第一相代謝反応による共有結合性が報告された薬物 (Figure 10) に対してトラッピングアッセイを行い, 得られたアダクト生成量と従来の手法によって得られた各薬物の共有結合量の報告値を比較した。結果を Table 4 に示した。

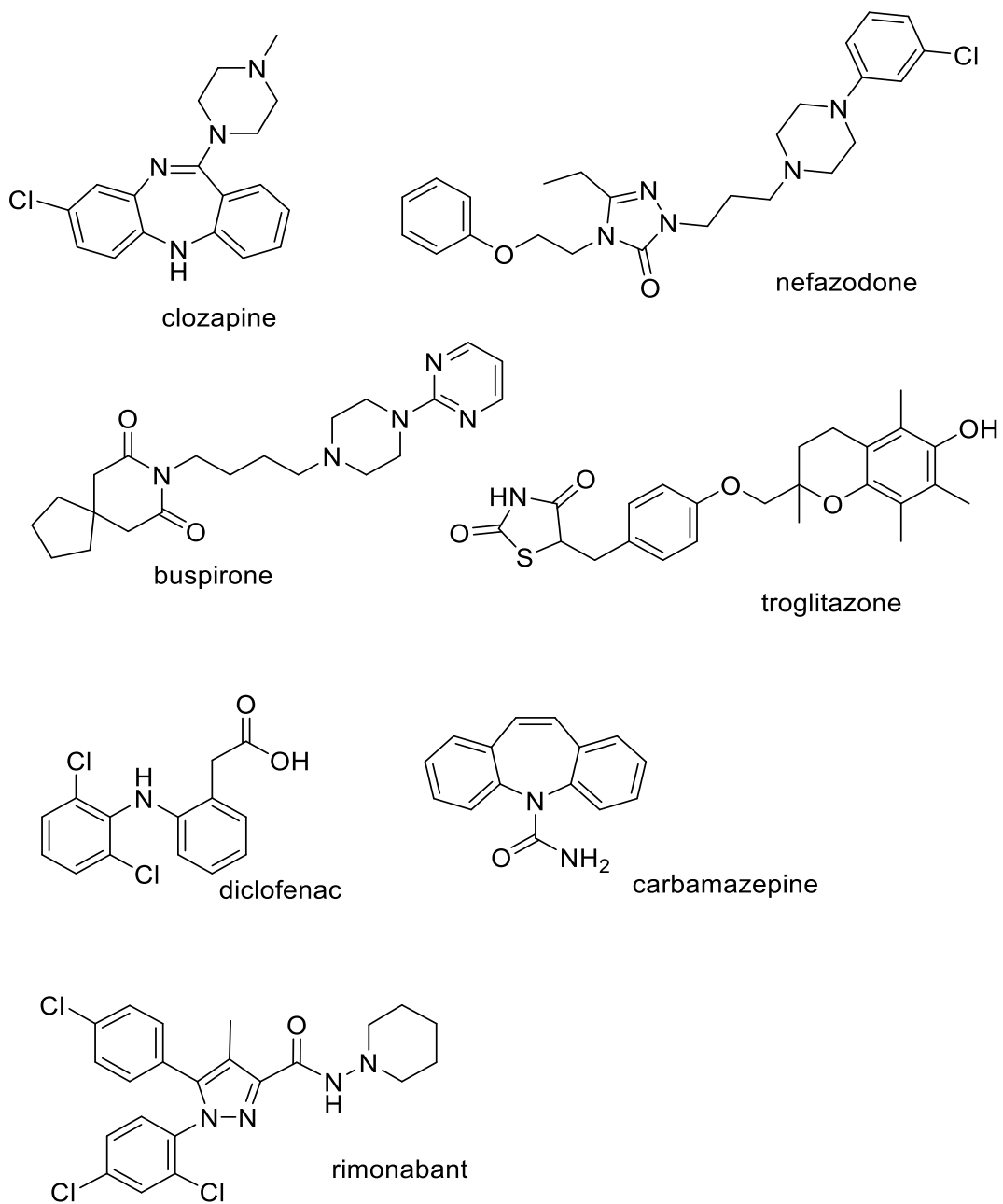


Figure 10. ヒト肝ミクロソームタンパクとの共有結合が報告されている薬物

Table 4. 各薬物のトラッピングアッセイの結果と報告された共有結合量

Compound	CVB (LMs) [pmol/mg/hr]	Cys adduct [pmol/mg/hr]	KCN adduct [pmol/mg/hr]
Buspirone	132 <sup>19</sup>	98	382
Carbamazepine	49 <sup>19,31</sup>	<100	--
Clozapine	195 <sup>32,35</sup>	429	<100
Diclofenac	57 <sup>19,31,32,35</sup>	257	--
Nefazodone	1848 <sup>19,31</sup>	2333	934
Rimonabant	920 <sup>40</sup>	<100	939
Troglitazone	1170 <sup>31</sup>	265	<100

--: No data

CVB: the extent of covalent binding

LMs: liver microsomes

KCN トラッピングアッセイは環状アミンを有する nefazodone, buspirone, rimonabant に対して実施し，ネガティブコントロールとして troglitazone, clozapine を評価した。carbamazepine の共有結合量は，49 pmol/mg/hr と比較的小さく，Radio-HPLC の検出感度を下回る結合ポテンシャルであったためにラジオクロマトグラム上でシステインアダクトを検出できなかったと考えられた。トラッピングアッセイによりアダクト生成を検出し，その生成量は報告された共有結合量から大きな乖離は見られなかったことから，本検討で確立した定量的トラッピングアッセイを行うことで高コストな放射性同位元素標識された薬物を使用することなく，薬物の反応性代謝物生成を定量的に評価できると考えられた。

### 第三節 考察

第一相代謝反応によって生じる反応性代謝物の定量的評価法を検討し、F-NMR 定量による共有結合量評価法および固相抽出を利用した定量的トラッピングアッセイ法を新規に構築した。ヒト肝ミクロソーム代謝サンプルの F-NMR 測定では、そのタンパク残渣から flutamide 由来ピークを検出することができた。その化学シフトは -61.7 ppm と溶媒添加サンプルにおける -61.2 ppm と異なる化学シフトを示しており、flutamide の反応性代謝物は代謝反応あるいはタンパクとの結合によりフッ素周辺の環境が変化していることが推察された。また、NADPH 生成系非添加群にはヒト肝ミクロソーム由来のフッ素スペクトルは認められなかったことから F-NMR によりフッ素シグナルを検出することで生体成分中の薬物を構造変化に依らず、定量的に評価を行うことができることが確認された。先行研究では米国の承認薬アルペリシブ等を投与した排泄試料で F-NMR 定量を行い、RI 標識体を用いたマスバランス試験と同等の実験結果が得られることが報告されているが<sup>41,42,43</sup>、共有結合した薬物に対する研究は行われていなかった。本研究では、タンパク残渣に共有結合した成分でも定量的に評価することが可能であることが新規に示された。放射能標識されたトラップ剤を用いた定量的トラッピングアッセイの前処理条件として検討した OASIS HLB は、薬物やその代謝物の前処理に一般的に用いられる<sup>44,45</sup>が、脂溶性相互作用に加えて極性相互作用により化合物を保持するため、シアニドが官能基に結合したことで放射能回収率が低かったと考察された。シアニドおよびシステインは ODS カラムによる保持は弱く<sup>39,46</sup>、C18 基を担体として有する SepPak tC18 では未反応のトラップ剤は保持せず、アダクトのみを保持したことで良好に抽出を行うことができたと考えられた。これまで放射性同位元素標識トラッピングアッセイは報告されていたものの、先行研究では被験物質濃度を 50 あるいは 100  $\mu\text{M}$  と非常に高濃度で実施されており、

反応性代謝物生成量の過小評価が懸念されていた。例えば，rosiglitazone の肝ミクロソーム代謝における親和性( $K_m$ )は 17.1~29.8  $\mu\text{M}$  と報告されており<sup>47</sup>，この  $K_m$  を超える被験物質濃度で試験を行うと代謝が飽和し，反応性代謝物生成量を過小に評価する。また，canagliflozin は各 CYP 分子種に対して  $\text{IC}_{50}$  16-80  $\mu\text{M}$  ほどの阻害能を示すことから<sup>48</sup>，薬物自身の CYP 阻害能により反応性代謝物の生成量が減少することもあると考えられる。このように，ヒト肝ミクロソームに対する  $K_m$  や CYP 阻害能が薬物によって異なることを考慮すると，高濃度で代謝試験を行うことで薬物の反応性代謝物生成量を過小に評価する懸念があることから，本研究では固相抽出法による前処理を行い，被験物質濃度 10  $\mu\text{M}$  条件で反応性代謝物生成を評価できるトラッピングアッセイを構築した。トラッピングアッセイにおけるトラップ剤の選択については，生成する反応性代謝物に適したトラップ剤を用いる必要があり，KCN トラッピングアッセイにより捕捉されるイミニウムはピペラジン，ピペリジン等の環状アミン構造を有する薬物で特徴的に生成する<sup>49</sup>と考えられている。複数の薬物に対して，KCN トラッピングアッセイを実施した結果，構造中に環状アミンを有する nefazodone, buspirone および nefazodone ではシアンアダクトが認められ，環状アミンを持たない clozapine, troglitazone ではシアンアダクトが生成しないことが確認された。Buspirone および nefazodone では，シアンアダクトに加えてシステインアダクトも検出されたことから，その構造中に環状アミンを有する薬物はシステインおよび KCN の両方のトラップ剤により，反応性代謝物を評価する必要があると考えられた。

本章では，第一相代謝反応によって生じる反応性代謝物について，定量的な評価法を新規に構築した。両評価法にて得られた共有結合量およびアダクト生成量は，RI 標識された薬物による共有結合量評価と同等の値が得られたことから，RI 標識体を得ることが難しい探索段階において反応性代謝物の評価を行うことがで



きると期待された。承認薬の多くは CYP を始めとする第一相代謝反応により，代謝されること<sup>17</sup>を踏まえると，本手法で大半の薬物が評価できると期待される。被験物質の放射性同位元素標識体が得られていない医薬品探索ステージにおいても，複数の化合物を対象に定量的な評価が可能であることから，効率的に安全な医薬品を開発するために活用できると考えられた。

## 第二章 第二相代謝反応による反応性代謝物の定量的評価法の新規構築

前章ではヒト肝ミクロソームを用いて、第一相代謝反応によって生成する反応性代謝物の定量的評価法を構築した。第一相代謝反応では、NADPH 存在下におけるヒト肝ミクロソームで CYP, FMO, AO, CES 等の複数の代謝酵素による反応が起こるのに対して、第二相代謝反応ではそれぞれミクロソームや細胞質等のマトリックスに対応する補酵素の存在下でグルクロン酸抱合や硫酸抱合、アミノ酸抱合代謝反応が進行する。一般的に第二相代謝反応により生成した代謝物は不活性と考えられているが<sup>50</sup>、アシルグルクロニドやアシル CoA 抱合体はその化学的不安定さから反応性を有すると報告されている<sup>51</sup>。Diclofenac や zomepirac 等のカルボン酸由来の反応性代謝物としてアシルグルクロニドがしばしば研究<sup>52</sup>されているが、アシル CoA 抱合体についての報告は少ない<sup>53</sup>。その理由として、アシル CoA 抱合体はアシルグルクロニドよりも顕著に反応性が高く<sup>54</sup>、タンパクへ共有結合性を示す<sup>55</sup>ことや、容易に加水分解を受けるために生体試料中で検出することが困難であることが考えられる。

しかし、近年、開発が進められていた MK-8666 や TAK-875 が肝毒性リスクにより開発が中止され、その原因としてアシル CoA 抱合体に由来する共有結合が毒性に関与していることが報告された<sup>56,57</sup>。これらの他にも構造中にカルボン酸を有する薬物として ibuprofen や diclofenac 等数多く存在しており、その反応性代謝物として生成しうるアシル CoA 抱合体の生成の有無を評価することは非常に重要である。本章では、アシル CoA 抱合体の反応性を定量的に評価することで、カルボン酸を有する薬物の毒性リスクを評価できると考え、適切なトラップ剤の検討、および化合物横断的にその生成量を定量的に評価できる実験系について検討を行った。

## 第一節 アシル CoA 抱合体のトラッピング試薬の探索

アシル CoA 抱合体は非常に不安定であるために安定に検出することは難しい。そこで、アシル CoA 抱合体を感度よく検出することができるトラッピング試薬について探索した。代表的なトラップ剤である GSH およびシステイン、リシンを検討した。被験物質には、アシル CoA 抱合体による共有結合性が報告されている Ibuprofen<sup>15</sup> を用いた。*In vitro* 代謝反応は、ヒト肝ミクロソームに補酵素およびトラップ剤として 5 mM GSH を加えて実施した。反応停止後の上清を高分解能 MS で Full scan 測定し、得られたアシル CoA 抱合体および GSH アダクト (M+GSH-H<sub>2</sub>O) の MS ピークエリアを Figure 11 に示した。4hr のインキュベーションを行ったサンプルにおいて GSH アダクトが痕跡程度検出されたものの、検出感度は非常に低いと考えられた。

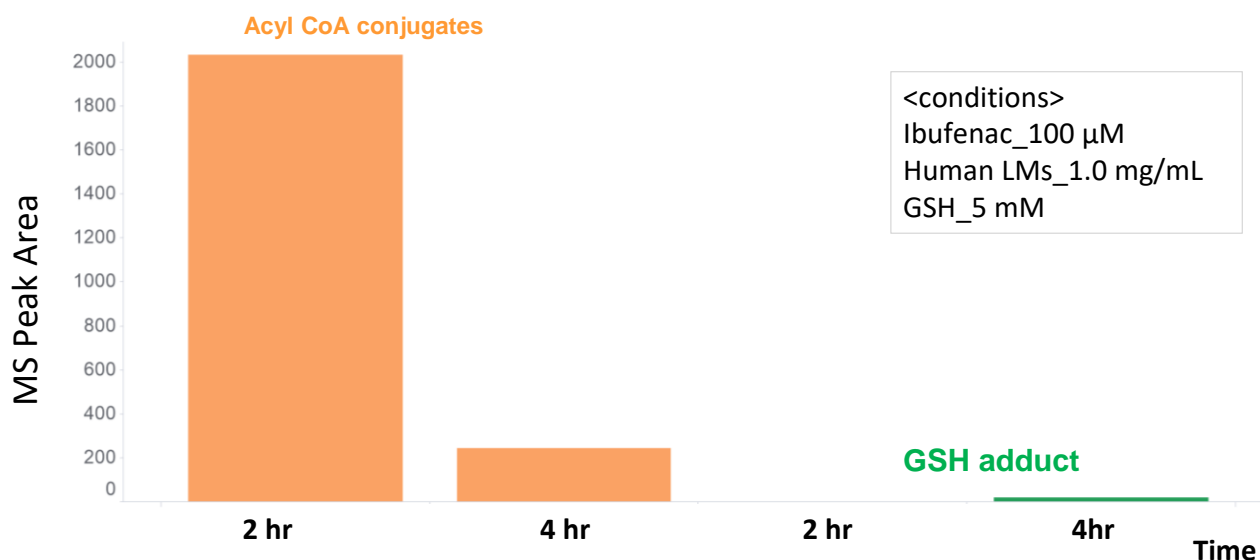


Figure 11. ヒト肝ミクロソーム反応液を LC/MS 測定した際の ibuprofen のアシル CoA 抱合体と GSH アダクトの MS ピークエリア

続いて、トラップ剤としてシステイン 1 mM または、リシン 5 mM を用いてアッセイを実施し、それぞれのアダクトの MS ピークエリアを Figure 12 に示した。システインをトラップ剤として用いた際には顕著なシステインアダクト ( $M + \text{Cys} - \text{H}_2\text{O}$ ) が検出されており、その生成量はインキュベーション時間に依存して減少し、代わりにシステインが 2 分子結合したと考えられるアダクト ( $M + \text{Cys} - \text{H}_2\text{O} + \text{Cys} - 2\text{H}$ ) が時間依存的に増加した。リシンでもアダクト ( $M + \text{Lys} - \text{H}_2\text{O}$ ) が認められたものの、その MS ピークエリアは非常に小さかった。

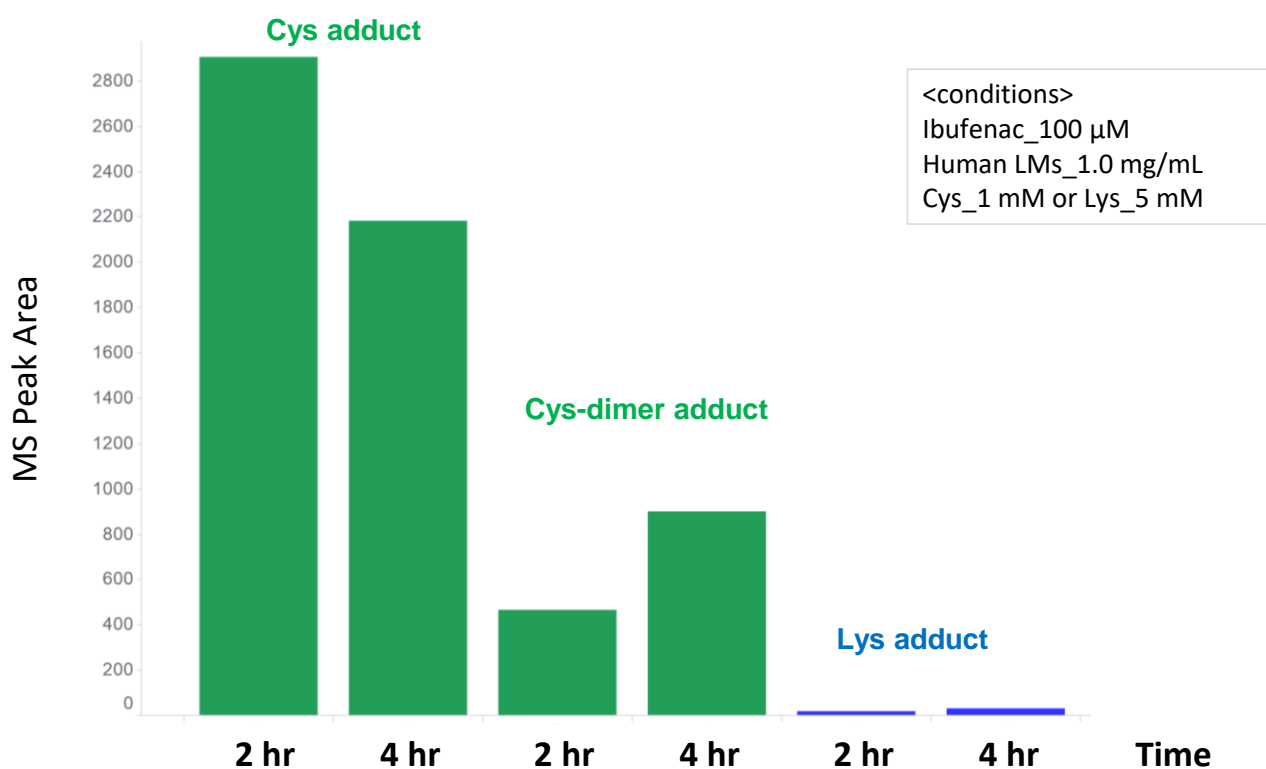


Figure 12. ヒト肝ミクロソーム反応液を LC/MS 測定した際の、ibufenac のアシル CoA 抱合体とシステインアダクトおよびリシンアダクトの MS ピークエリア

顕著なピークが認められた ibufenac-システインアダクトについて、LC/MS/MS 測定を行い、得られたスペクトルと想定されるアダクトの構造を Figure 13 に示した。ibufenac は、カルボン酸部分とシステインのアミノ基で結合し、安定なアミド構造を形成していると考えられた。

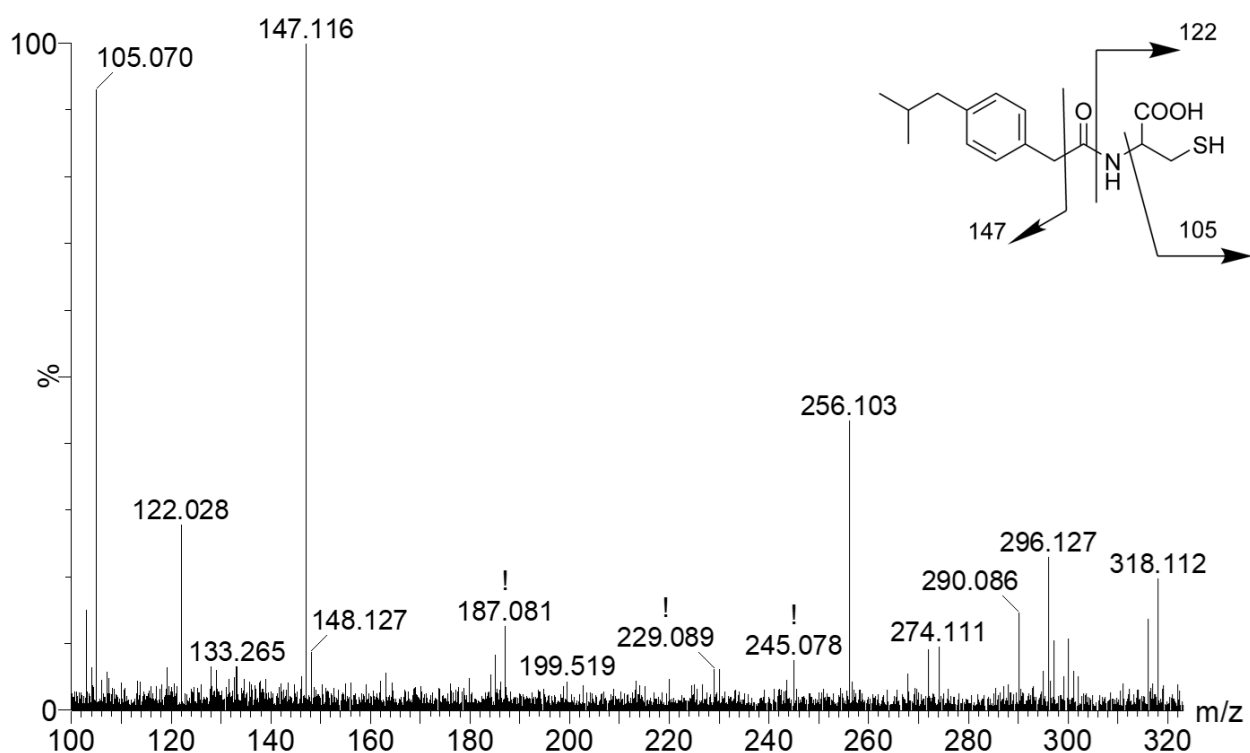


Figure 13. ibufenac-システインアダクトの MS/MS スペクトル

以上の結果から、GSH、システインおよびリシンは Figure 14 に示すメカニズムによりアシル CoA 抱合体とのアダクトを形成すると示唆された。リシンによる直接のアミド化によるアダクト生成量は比較的少ないことから、システインが有するチオール基およびアミノ基の両方がアダクト形成に寄与していると考えられた。

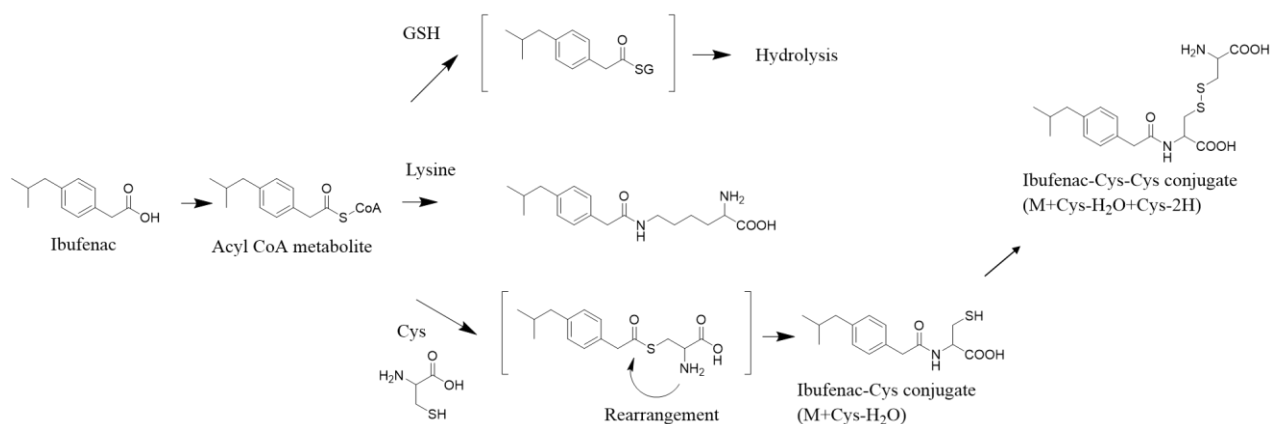


Figure 14. Ibufenac のアシル CoA 抱合体と GSH, システインおよびリシンの反応メカニズム

## 第二節 アシル CoA 抱合体トラッピングアッセイの構築

システインがアシル CoA 抱合体とアダクトを形成することが確認できたものの、生成したシステインアダクトが更に酸化を受けて経時的に減少することが明らかになった。そこでアッセイの感度を更に向上させる目的で、還元剤である dithiothreitol (DTT) を添加することで二量体の生成をほぼ抑え、システイン濃度を 1mM から 5 mM に増加させた条件で検討を行った。また、アシル CoA シンテターゼ活性向上を期待して、アシル CoA シンテターゼの活性化剤として報告されている Triton X-100 や UGT 代謝反応時にしばしば用いられる alamethicin を添加して実験を行った。被験物質として ibufenac を用い、各アッセイ条件において、得られたシステインアダクトの MS ピークエリアを Figure 15 に示した。DTT 添加およびシステイン濃度の増加により、システインアダクト生成量は顕著に増加し、また、Triton X-100 を 0.1% から 1.0% の濃度範囲において、濃度によらず反応液中に添加した際にシステインアダクトの生成量は増加した。一方で、alamethicin 添加による影響は認められなかった。

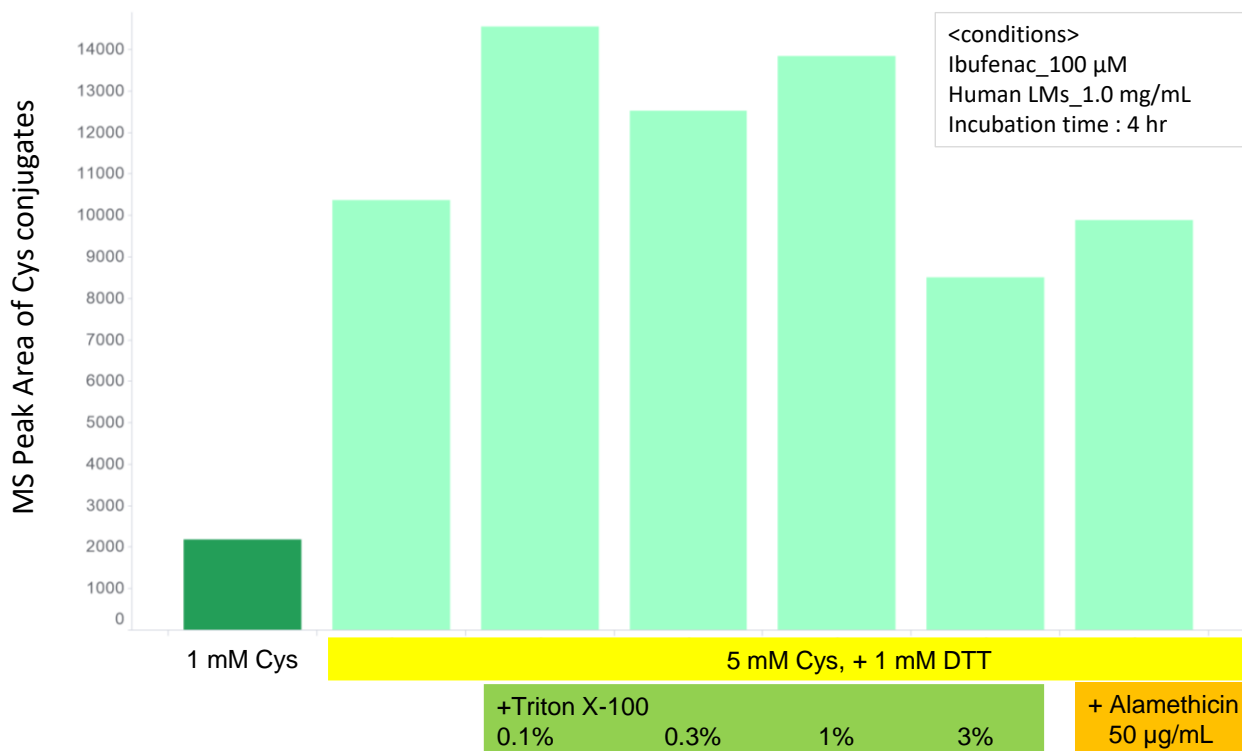


Figure 15. アシル CoA トラッピングアッセイ時のシステイン付加体の MS ピーク エリア

DMSO は化合物の保存溶媒としてよく用いられているが<sup>58</sup>, CYP 活性を減弱させることが知られている<sup>59</sup>。そこで, アシル CoA トラッピングアッセイ構築にあたり, ヒト肝ミクロソームにおけるアシル CoA シンテターゼ活性への DMSO の影響を確認した。反応液中の DMSO 濃度を 0.1% から 5% として, トラッピングアッセイを行った結果を Figure 16 に示した。システインアダクト生成量を比較したところ, DMSO 濃度 1% まで影響は認められなかった。

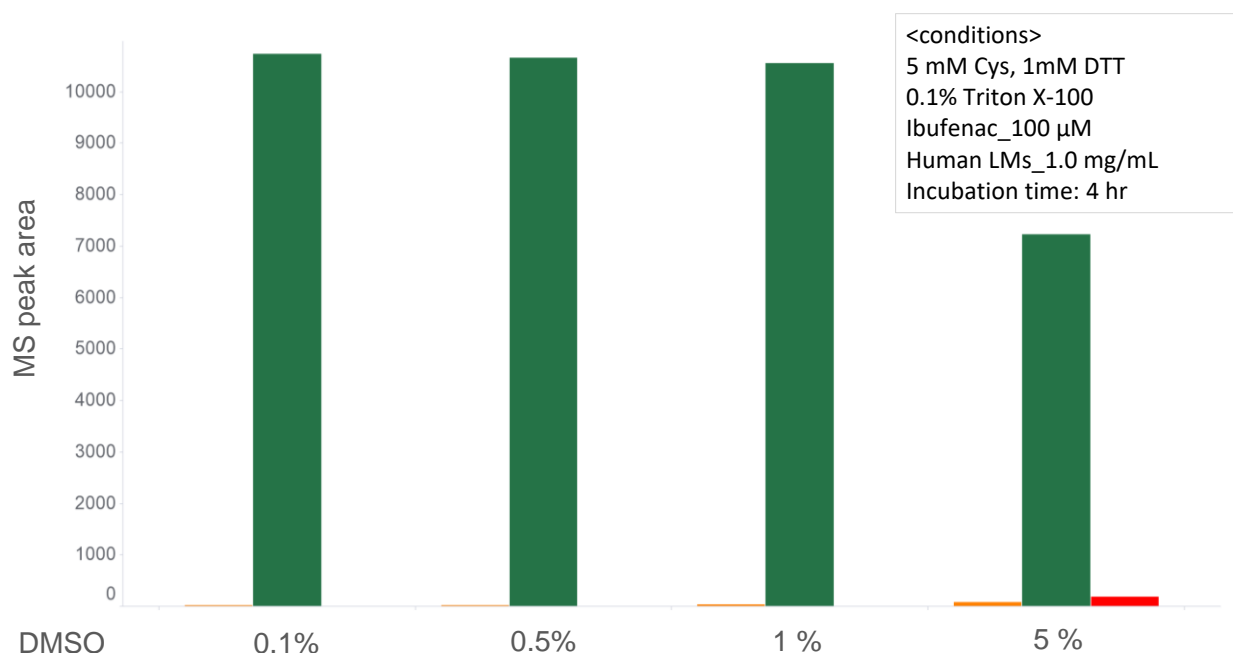


Figure 16. Ibufenac のアシル CoA トラッピングアッセイにおける DMSO 濃度の影響 (アシル CoA 抱合体(orange), システインアダクト(green)およびシステイン 2 量体アダクト(red))

### 第三節 $[^{35}\text{S}]$ Cys トラッピングアッセイおよび非標識 Cys トラッピングアッセイのアダクト生成量の比較

前節までの ibufenac を用いて行った試験条件の検討では LC/MS で検出してきたが, LC/MS で得られる MS ピークエリアによる検出では化合物毎に感度が異なることから標準物質なしに定量することは難しい。また複数の薬物間で, そのアダクト生成量を比較するためには, 適切な手法により定量を行う必要がある。そこで, トラップ剤として放射性同位元素標識された $[^{35}\text{S}]$ システインを用いて, 定量的なトラッピングアッセイを試みた。被験物質として, アシル CoA 抱合体による共有結合が報告されている ibufenac, fenclozic acid, ibuprofen<sup>15</sup>を評価した。実



験条件は、前節で検討した実験条件に準じて実施し、インキュベーション後、10 mM DTT を含む 2 倍量のアセトニトリルで反応を停止させ、Radio-HPLC で分析を行った。得られた Radio-HPLC クロマトグラムを Figure 17 に示した。Radio-HPLC クロマトグラム上のピークエリアから算出した各薬物のシステインアダクト生成量は、Table 5 に示した。

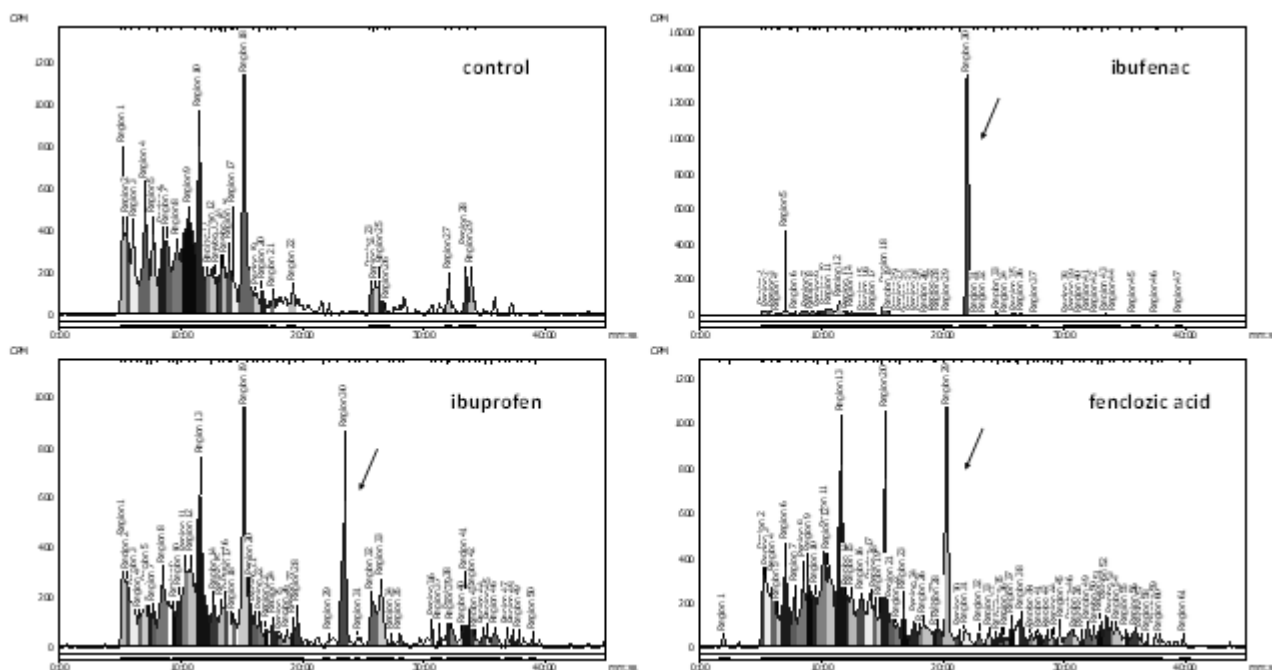


Figure 17. コントロールサンプル（被験物質なし）および ibufenac 評価サンプルの Radio-HPLC クロマトグラム

Table 5. [<sup>35</sup>S]システインアダクト生成量と報告された共有結合量

Name	[ <sup>35</sup> S] システイン アダクト生成量 (pmol/mg/4 h)	共有結合量 (pmol/mg/hr)
Ibufenac	16,808	8600
Fenclozic acid	1,403	200
Ibuprofen	978	1000

被験物質濃度 | [<sup>35</sup>S] システイントラッピングアッセイ :100 μM, RI 標識体を用いた共有結合性評価: 200 μM

いずれの薬物についてもシステインアダクトが検出されたことが確認された。

更に RI を用いることなく定量的に評価できる別手法についても検討を行った。被験物質には [<sup>35</sup>S]システイントラッピングアッセイと同様に ibufenac, fenclozic acid, ibuprofen について試験を実施し, 各試料測定時の親化合物の極大吸収波長における UV クロマトグラム上のピークエリアからシステインアダクト生成量を算出した。 [<sup>35</sup>S]システイントラッピングアッセイおよび非標識システイントラッピングアッセイで得られたアダクト生成量について, それぞれ Table 6 に示した。

Table 6. [ $^{35}\text{S}$ ] システインアダクトの生成量および非標識システイントラッピングアッセイにおけるアダクト生成量

Name	[ $^{35}\text{S}$ ] システイン アダクト生成量 (pmol/mg/4 h)	非標識システイン アダクト生成量 (UV 算出) (pmol/mg/4 h)
Ibufenac	16,808	75,591
Fenclozic acid	1,403	6,480
Ibuprofen	978	5,685

試験条件 | [ $^{35}\text{S}$ ] システイン濃度 1 mM, 非標識システイン濃度 5 mM

検出波長 | 264 nm (ibufenac), 293 nm (fenclozic acid), 264 nm (ibuprofen)

[ $^{35}\text{S}$ ] システインおよび非標識システインアダクト生成量を比較したところ、そのアダクト生成量は良好に相関し、非標識システインを用いたトラッピングアッセイにより、簡便かつ定量的にアシル CoA 抱合体による反応性を評価することができると考えられた。

#### 第四節 考察

本章では ibufenac を用いてアシル CoA トラッピングアッセイを検討し、システインがアシル CoA 抱合体と安定な結合体を形成することを新規に見出し、更に得られたアダクトを定量的に評価できる評価系を構築した。トラップ剤検討にグルタチオンやリシンをトラップ剤として用いた際には検出感度が非常に低かった。これはグルタチオンアダクトがアシル CoA 抱合体と同様に不安定なチオエステル構造を有し、容易に加水分解を受けたためと考えられた。また、リシンのアミ

ノ基の pKa は 10.4<sup>60</sup> であるため、アッセイ条件である pH7.4 ではほとんどがイオン型となり求核性が減弱したためと考えられた。システインはチオール基とアミノ基の両方が機能することで優れた検出力と安定性を示すため、アシル CoA 抱合体を検出するうえで非常に優れたトラップ剤だと考えられた。アシル CoA シンテターゼ活性化剤として alamethicin および Triton X-100 の影響を確認した。Alamethicin はミクロソーム膜に穴を形成することで補酵素の酵素へのアクセスを向上させると考えられているが<sup>61</sup>、システインアダクト生成量に影響を及ぼさなかった。Triton X-100 はアシル CoA シンテターゼ活性を向上させ、膜内側への基質や補酵素のアクセス向上とは異なるメカニズムによりアシル CoA シンテターゼが活性化されていると考えられた。また、DMSO の代謝活性に及ぼす影響を確認したところ、1% DMSO 存在化でアダクト生成量に減弱は認められなかったことから、医薬品のスクリーニングにおいて一般的な被験物質濃度 10 mM の DMSO ストック溶液<sup>62</sup> から終濃度 100  $\mu$ M のアッセイが行うことができることが確認できた。Ibuprofen および ibuprofen は、いずれもヒト肝ミクロソームにおいてアシル CoA 抱合体を生じることにより共有結合性を示し、その共有結合力に 10 倍近い違い (ibuprofen 8,600 pmol/mg/hr, ibuprofen 1,000 pmol/mg/hr) があることが報告されている<sup>15</sup>。 [<sup>35</sup>S] システインを用いたトラッピングアッセイで、これらを比較したところ、ibuprofen では 16,808 pmol/mg/4hr, ibuprofen では 978 pmol/mg/4hr のアダクトを生成し、報告された共有結合力で認められた 10 倍程度の違いを概ね示したことから、共有結合力と同様にアシル CoA 抱合体の反応性を評価できたと考えられた。更に非標識トラップ剤を用いたシステイントラッピングアッセイを実施し、そのシステインアダクト生成量を UV クロマトグラム上のピークエリア比から算出したところ、 [<sup>35</sup>S]システインアダクト生成量と良好に相関することが確認された。これは、システインにより形成したアミド構造は親

化合物の主な UV 吸収部位である芳香環から離れており，そのアダクトの極大吸収波長における UV 吸収は親化合物から大きく変化していないために精度よく UV 波長にて定量ができたためと考えられた。

以上の結果から，本研究で新規に構築したアシル CoA トラッピングアッセイにより，放射性同位元素標識体を用いることなく，アシル CoA 抱合体に由来する反応性代謝物生成リスクを定量的に評価することができると考えられた。

### 第三章 反応性代謝物曝露量に基づく肝障害リスク予測

前章までで、第一相代謝反応および第二相代謝反応によって生じる反応性代謝物の定量的評価法を構築した。それぞれの評価法で得られた実験値は、薬物から生じる反応性代謝物の共有結合性を反映していると考えられた。反応性代謝物による特異体質性肝障害のリスク要因には、肝ミクロソームや肝細胞代謝試験における共有結合量だけでなく臨床用量との関係も示唆されている。肝細胞代謝試験における共有結合量と一日投与量を組み合わせた経験則に基づいたリスク評価法<sup>32</sup>や代謝物量全体に占める反応性代謝物の割合から算出した covalent binding (CVB) burden によるリスク予測<sup>63</sup>が提案されているが、いずれの評価においても放射性同位元素標識化合物を用いた肝細胞試験時の共有結合量を用いており、肝代謝以外による消失を考慮できていない。そこで、反応性代謝物によるリスクをより精度よく見積もるため、*in vitro* 反応性代謝物生成速度と親化合物の臨床での曝露量 (AUC) から、ヒト生体内における反応性代謝物量生成量を推定し、薬物の肝毒性リスクとの相関を検証した。

#### 第一節 共有結合量と曝露による肝障害リスク予測

経口薬の生体内での反応性代謝物生成量は、下記の式により算出される<sup>64</sup>。

$$X_{RM} = \text{Dose} \times f_a \times f_m \times f_{RM}$$

$X_{RM}$ : 体内で生成する反応性代謝物量

Dose: 一日当たりの投与量

$f_a$ : 消化管吸収率

$f_m$ : 肝代謝により消失する割合

$f_{RM}$ : 肝代謝のうち、反応性代謝物を生成する割合

上記の式のうち、 $f_m \times f_{RM}$  は全身クリアランスに占める反応性代謝物生成クリアランスの割合 ( $CL_{RM}/CL_{total}$ ) から算出される。ここで  $CL_{RM}$  は *in vitro* 代謝試験における代謝速度に、肝における CYP 含量および肝重量を補正することで肝固有クリアランスを見積もる IVIVE 法<sup>65</sup>により算出を行った。第一相代謝反応については、肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験から *in vivo* 代謝クリアランスを予測する手法がよく研究されており、本研究では Obach が報告した well stirred model を簡略化した予測法<sup>66</sup>を用いて、反応性代謝物生成量を推定した。本検討では、ヒト生体内における一日あたりの反応性代謝物生成量 ( $X_{RM}$ ) を Reactive metabolite (RM) burden と定義し、下記の式にて算出した。

$$RM\ burden = Dose \times f_a \times f_m \times f_{RM} = Dose \times f_a \times \frac{CL_{RM}}{CL_{total}}$$

$$F = f_a \times f_g \times f_h \Leftrightarrow f_a = \frac{F}{f_g \times f_h} \text{であるため,}$$

$$RM\ burden = CL_{RM} \times \frac{Dose}{CL_{total}/F} \times \frac{1}{f_g \times f_h}$$

ここで  $f_g \times f_h = 1$  と仮定すると、

$$RM\ burden = CL_{RM} \times AUC_{oral}$$

Dose: 一日あたりの投与量

$f_g$ : 吸収された薬物のうち、消化管代謝を免れた割合

$f_h$ : 肝初回通過効果を免れた割合

$AUC_{oral}$  経口投与時の血漿中濃度時間曲線下面積

$CL_{RM}$  反応性代謝物生成クリアランス

CL<sub>RM</sub> は下記の式に従い，算出した。一般に共有結合量算出時の *In vitro* 代謝試験時の被験物質濃度は 10 μM であることから，ヒトにおける肝重量あたりのミクロソームタンパク含有量および体重あたりの肝臓重量を乗じて算出した。

$$CL_{RM} = \text{共有結合量} \left( \frac{\text{pmol}}{\text{mg hr}} \right) \times \frac{1}{10} \left( \frac{1}{\mu\text{M}} \right) \times 45 \left( \frac{\text{mg protein}}{\text{g liver}} \right) \times 20 \left( \frac{\text{g liver}}{\text{kg}} \right)$$

肝ミクロソーム代謝試験時の共有結合量が先行報告より収集できた 48 個の薬物<sup>31,32,35,40</sup>について，経口投与時の曝露量，投与量，経口クリアランス，薬物の安全性についての情報を FDA, EMA 及び PMDA 申請資料および先行研究より収集した<sup>67,68,69,70,71,72,73,74,75</sup>。なお，同じ薬剤で複数の値が得られたものは平均値を算出して用いた。薬物の安全性については，薬物の添付文書に肝障害の記載のないものを safe, warnings and precautions に肝障害の記載のあるものを warning, 薬物の添付文書冒頭に boxed warning があるものを boxed warning, 肝障害を理由として市場撤退したものを withdrawn と分類した。各薬物について収集した共有結合量，投与量，AUC および算出した RM burden を Table 7 に示した。また薬物のヒト肝ミクロソームに対する結合量，投与量を乗じた数値，本研究で新規に算出した RM burden について，薬物のリスク分類を横軸にプロットした図を Figure 18 に示した。



Table 7. 薬物の投与量, 経口クリアランス, 肝ミクロソームへの共有結合量および算出した RM burden

Compound	Dose [mg/day]	CL/F [L/hr/kg]	Drug Label	CVB (LMs) [pmol/mg/hr]	RM burden [mg/day]
Acetaminophen	4000	0.243	Boxed warning	113 <sup>19,31,32</sup>	167.9
Alpidem	150	0.39	Withdrawn	440 <sup>31</sup>	15.2
Aminopyrine	3000	0.177	Withdrawn	31 <sup>32</sup>	47.1
Amlodipine	10	0.398	Safe	7 <sup>32</sup>	0
Atorvastatin	80	0.517	Warning	352 <sup>32</sup>	4.9
Benzbromarone	150	0.09	Boxed warning	390 <sup>32</sup>	58.6
Buspirone	60	44.8	Safe	139 <sup>19</sup>	0.02
Caffeine	900	0.084	Safe	6 <sup>31,32</sup>	6.2
Carbamazepine	1200	0.069	Boxed warning	49 <sup>19,31</sup>	77.3
Celecoxib	400	0.467	Warning	13 <sup>32</sup>	1
Clozapine	900	0.313	Boxed warning	195 <sup>32,35</sup>	50.4
Dexamethasone	10	0.268	Warning	445 <sup>31</sup>	3
Diclofenac	200	0.498	Warning	57 <sup>19,32,35</sup>	2.1
Donepezil	10	0.115	Safe	30 <sup>32</sup>	0.2
Erythromycin	1000	0.84	Warning	57 <sup>32</sup>	6.1
Ethinylestradiol	0.035	0.3	Safe	938 <sup>32</sup>	0
Fluoxetine	80	0.108	Warning	15 <sup>32</sup>	1
Furosemide	80	0.092	Warning	79 <sup>32</sup>	6.2
Imipramine	300	2.411	Warning	202 <sup>31,32</sup>	2.3
Levofloxacin	750	0.108	Safe	0 <sup>32</sup>	0.1
Losartan	100	1.528	Warning	105 <sup>31</sup>	0.6

Meloxicam	15	0.008	Safe	60 <sup>19</sup>	9.5
Nefazodone	600	2.153	Boxed warning	1848 <sup>19, 31</sup>	46.3
Nevirapine	400	0.023	Boxed warning	19 <sup>32</sup>	30.6
Olanzapine	20	0.393	Safe	139 <sup>32</sup>	0.6
Olmesartan	40	0.066	Safe	3 <sup>32</sup>	0.2
Paroxetine	50	0.516	Warning	2669 <sup>19, 31</sup>	23.3
Phenytoin	600	0.036	Warning	4 <sup>32</sup>	6.5
Pioglitazone	45	0.051	Warning	295 <sup>31, 32</sup>	23.4
Pravastatin	80	0.432	Safe	4 <sup>32</sup>	0.1
Procainamide	4000	3.8	Warning	5 <sup>32</sup>	0.5
Propranolol	480	2.586	Warning	221 <sup>19, 32</sup>	3.7
Rimonabant	20	0.087	Safe	920 <sup>40</sup>	19
Ritonavir	1200	0.126	Boxed warning	253 <sup>32</sup>	217.6
Rosiglitazone	8	0.081	Safe	853 <sup>31, 32</sup>	7.6
Sertraline	200	2.364	Warning	49 <sup>31</sup>	0.4
Sudoxicam	50	0.006	Withdrawn	35 <sup>19</sup>	26.5
Tacrine	160	11.683	Warning	201 <sup>31, 32</sup>	0.2
Tamoxifen	40	0.102	Warning	12 <sup>32</sup>	0.4
Ticlopidine	600	2.678	Boxed warning	1072 <sup>31, 32</sup>	21.6
Tienilic Acid	500	0.056	Withdrawn	935 <sup>19, 31, 32</sup>	754.8
Troglitazone	600	0.571	Withdrawn	1170 <sup>31</sup>	110.7
Valproic Acid	4200	0.012	Boxed warning	6 <sup>32</sup>	200.8
Valsartan	320	0.136	Safe	1 <sup>32</sup>	0.3
Venlafaxine	225	1.51	Safe	5 <sup>31</sup>	0.1
Warfarin	10	0.004	Safe	16 <sup>32</sup>	3.7

Zafirlukast	40	0.48	Warning	$36^{32}$	0.3
Zolpidem	10	0.244	Safe	$23^{31}$	0.1

---

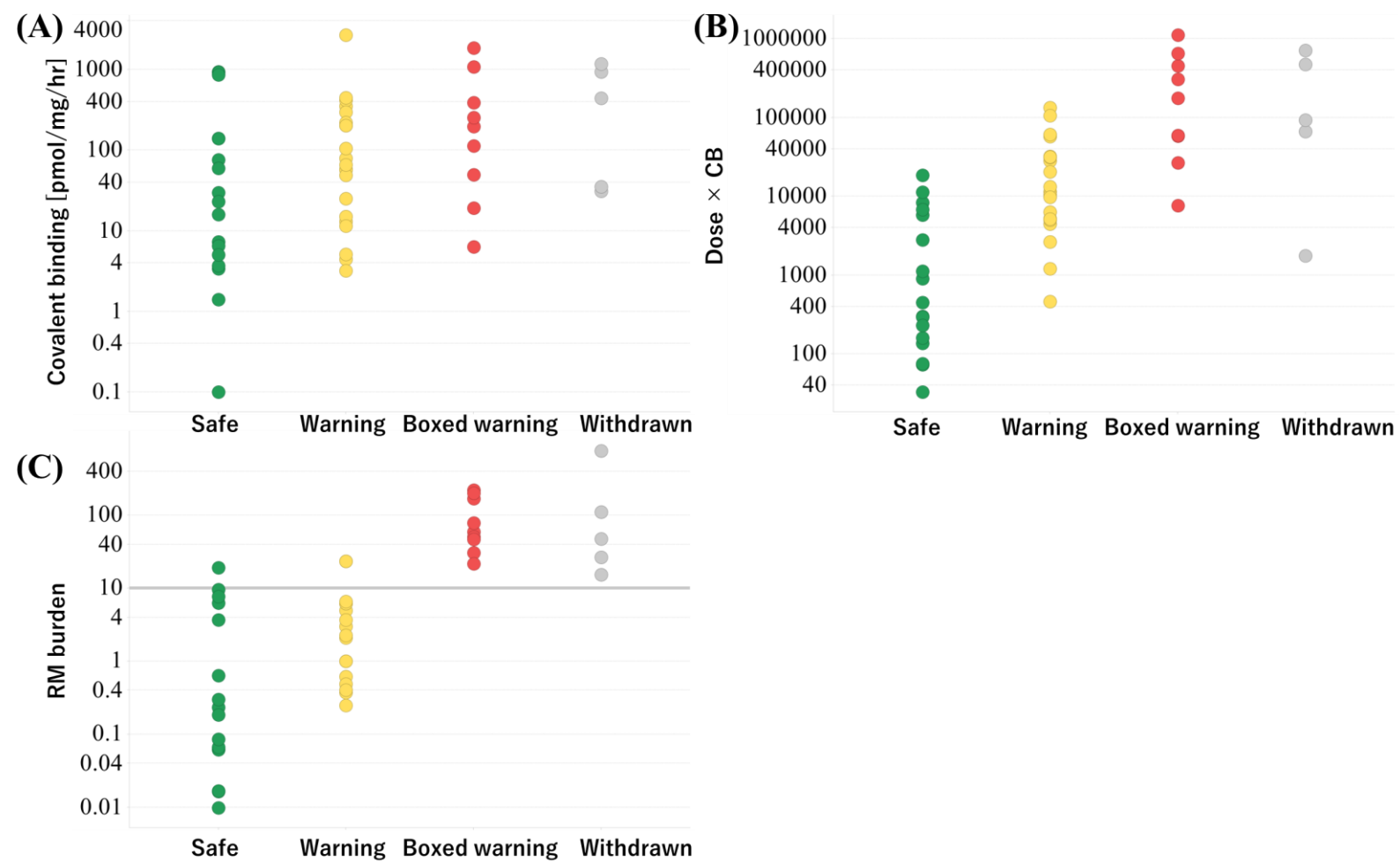


Figure 18. 共有結合量 (A), 投与量 × 共有結合量 (B), RM burden (C) と薬物のリスク分類の関係

共有結合量と薬物のリスク分類についてプロットを作成したところ、明確な相関は認められなかった (Figure 18A)。そこで、共有結合量に投与量を乗じたところ、相関が改善し (Figure 18B)、更に RM burden ではリスク分類では良好な相関を示した (Figure 18C)。Uetrecht による解析では経験的に投与量 10 mg/day を下回る薬物は肝障害リスクが低いと報告されている<sup>76</sup>ことから、RM burden 10 mg/day を基準値、Withdrawn および Boxed warning の薬物を陽性、warning および safe を陰性として、肝障害リスク予測を行ったところ、感度は 14 薬物中 14 薬物、特異度は、34 薬物中 31 薬物と共に良好な予測性を示し、反応性代謝物の体内曝露を考慮することで肝障害の予測性が向上することが示された。

## 第二節 トラッピングアッセイを用いた肝障害リスク予測

第一節の結果から、共有結合量に親化合物の曝露を考慮し、生体内での反応性代謝物生成量を推定することで、肝障害リスクの予測精度が向上することを示した。第一章、第二章では反応性代謝物生成量を定量的に評価する実験系を構築してきたことから、これらの実験値を用いることでも肝障害リスクを精度よく予測できることが期待された。

そこで、第一章で算出したシステインアダクト生成量を用いて RM burden を算出し、そのリスク分類との相関を確認した。共有結合量およびアダクト生成量から算出した RM burden を Table 8 に示した。また、各薬物の RM burden とリスク分類を Figure 19 に示したところ、共有結合量を用いて算出した際と、同様に良好な予測性を示した。

Table 8. 共有結合量およびアダクト生成量から算出した RM burden

Compound	Drug Label	RM burden (共有結合) [mg/day]	RM burden (トラッピングアッセイ) [mg/day]
Buspirone	Safe	0.02	0.05
Carbamazepine	Boxed warning	77.3	N.C.
Clozapine	Boxed warning	50.4	111
Diclofenac	Warning	2.1	9.3
Nefazodone	Boxed warning	46.3	58.5
Rimonabant	Safe	19	19.4
Troglitazone	Withdrawn	265	25.1

N.C. Not calculated

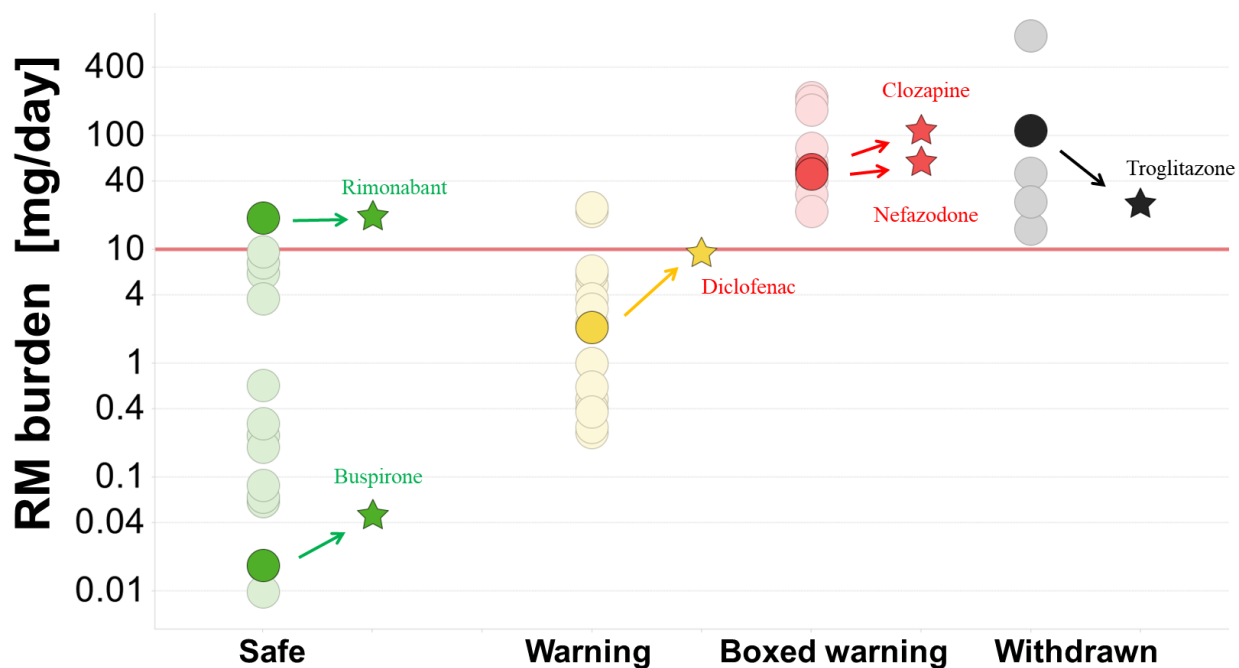


Figure 19. トラッピングアッセイ時のアダクト生成量を用いて算出した RM burden と各薬物のリスク分類（円形：共有結合量から算出した RM burden，星形：システムアダクト生成量から算出した RM burden）

続いて、第二章で構築した第二相代謝反応により生成する反応性代謝物について評価を行った。第二相代謝反応で生成する反応性代謝物であるアシル CoA 抱合体およびアシルグルクロナイドは化学的に不安定なチオエステルおよびエステル構造を有し、タンパクと共有結合を示す<sup>77</sup>。第二章ではシステインによるトラッピングアッセイによりアシル CoA 抱合体の反応性を定量的に評価できることを示した。ここでは更に、カルボン酸を有する薬物の反応性代謝物と臨床で認められた肝障害との関係性を把握する目的で、カルボン酸を有する 17 薬物(Figure 20)を評価し、リスク分類との相関を確認した。評価した薬物の親化合物の曝露(AUC)は申請資料および先行報告<sup>81,82,83,84,85</sup>より収集した。

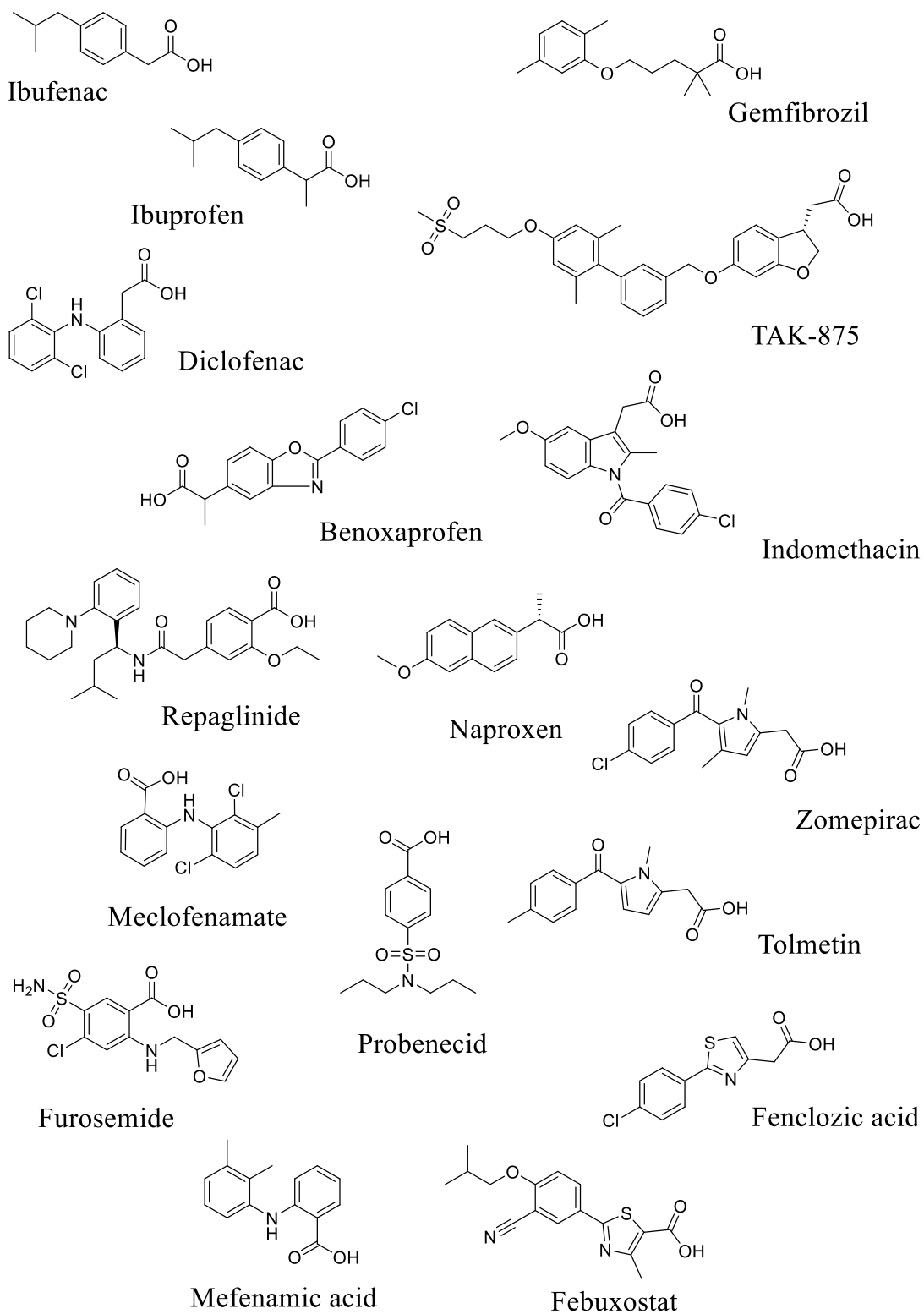


Figure 20. 構造中にカルボン酸を有する薬物



17 個の薬物に対してアシル CoA トラッピングアッセイを実施し、システインアダクト生成量を得た。前節で示した通り、生体内での反応性代謝物の生成量は、親化合物の曝露量に比例すると考えられたことから、親化合物を経口投与した際の AUC を各薬物のシステインアダクト生成量に乗じた値を算出した (Table 9)。それぞれの値に対する薬物のリスク分類の関係をプロットし、Figure 21 に示したところ、AUC を乗じたことにより、システインアダクト生成量による肝障害リスク予測性は向上したと考えられた。

Table 9. カルボン酸を有する薬物の投与量, アシル CoA トラッピングアッセイ時のシステムインダクト生成量および親化合物の曝露量

Label	Name	Dose (mg)	Formation rate of Cys conjugate (detected as 'M+Cys-H <sub>2</sub> O') [pmol/mg/4 h]	AUC [μg·h/mL]	Formation rate × AUC [pmol/mg/4 h × μg·h/mL]
Withdrawn	Ibufenac	4000	75,591	1780	134,522,049
Withdrawn	Fenclozic acid	300	6,480	2126	13,772,833
Withdrawn	TAK-875	50	5,569	44.2	246,152
Withdrawn	Benoxaprofen	1200	413	6036	2,494,092
Withdrawn	Zomepirac	600	55	2855	157,709
Warning	Ibuprofen	3200	5,685	915.2	5,203,338
Warning	Tolmetin	1800	312	312	97,424
Warning	Probenecid	1000	318	827	263,337
Warning	Gemfibrozil	1200	142	125	17,778
Warning	Febuxostat	60	58	12.1	703
Warning	Diclofenac	150	N.D.	3.67	N.C.
Warning	Mefenamic acid	1250	N.D.	93.8	N.C.
Warning	Indomethacin	200	N.D.	30.6	N.C.
Warning	Naproxen	1000	N.D.	2652	N.C.
Safe	Meclofenamate	400	N.D.	48.5	N.C.
Safe	Furosemide	80	N.D.	7.18	N.C.
Safe	Repaglinide	16	N.D.	0.367	N.C.

N.D. Not detected., N.C. Not calculated

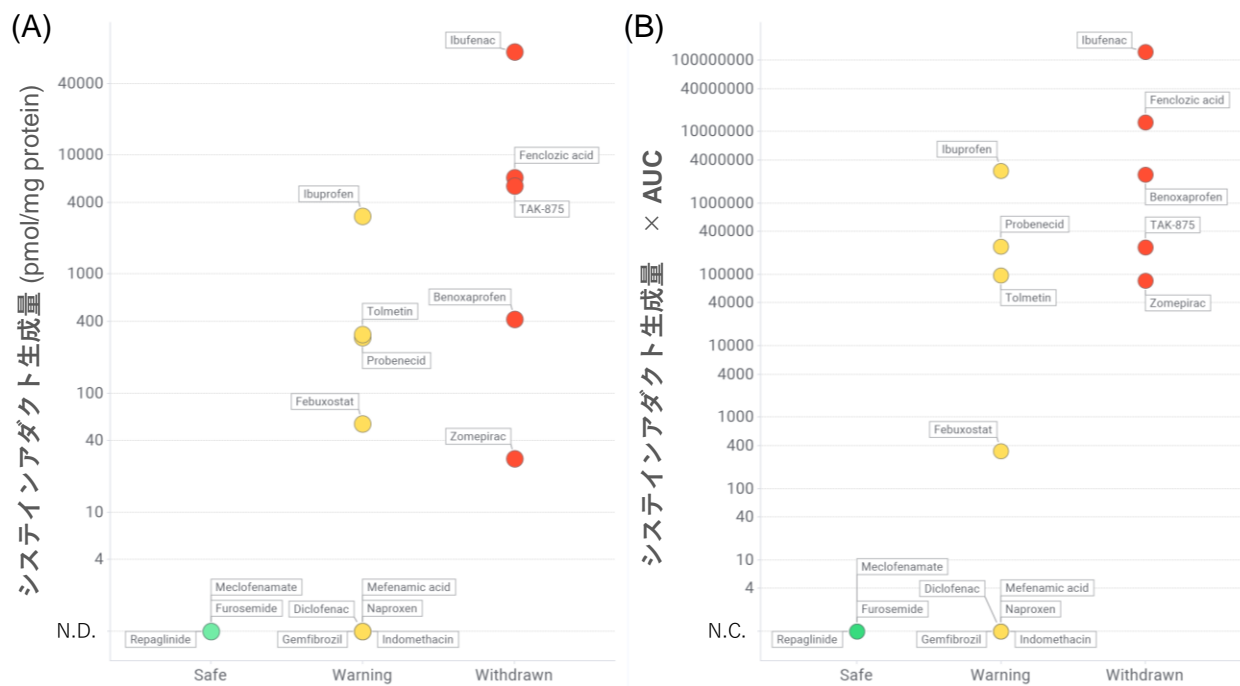


Figure 21. アシル CoA ト ラ ッ ピ ン グ ア ッ セ イ 時 の ア ダ ク ト 生 成 量 お よ び AUC を 乗 じ た 値 と リ ス ク 分 類 の 関 係

構造中にカルボン酸を有する薬剤から生じる反応性代謝物には、アシル CoA 抱合体の他に、アシルグルクロニドが知られている。アシルグルクロニドによる毒性リスク予測ではバッファー中における安定性が肝障害リスクとよく相関することが報告されている<sup>52</sup>が、アシルグルクロニドの合成標品を必要とすることや代謝物自身の生成量が考慮されておらず、リスク予測の精度には課題がある。アシルグルクロニドが反応性を示すメカニズムは Figure 22 に示すように、アルデヒド部分による可逆的なグリケーション反応、およびエステル部分による不可逆的なアシレーション反応によると考えられている<sup>79</sup>。第二章で検討したシステインによるトラッピングアッセイの反応メカニズムからアシルグルクロニドのエステル構造の反応性を評価できることが想定されたことから、ヒト肝ミクロソームに補酵素として uridine-5-diphosphoglucuronic acid (UDPGA)を加え探索的にアシルグルクロニドトラッピングアッセイを実施した。*In vitro*での UGT 活性は低く、定量的に予測することは非常に難しい<sup>61</sup>ことから、アシル CoA 抱合体のリスク評価と同様にアッセイで得られたアダクト生成量に親化合物の AUC を乗じた値を用いて解析に用いた。カルボン酸を有する 17 化合物についてアシルグルクロニドトラッピングアッセイを実施し、得られたシステイン結合量および親化合物 AUC を乗じた値を Table 10 に示した。更に、Figure 23 に示すように、薬物ラベルについて、システインアダクト生成量および AUC を乗じた値をプロットしたところ、薬物の肝毒性リスクとシステインアダクト生成量に明確な相関は認められなかったものの、AUC を乗じた数値では相関が改善した。

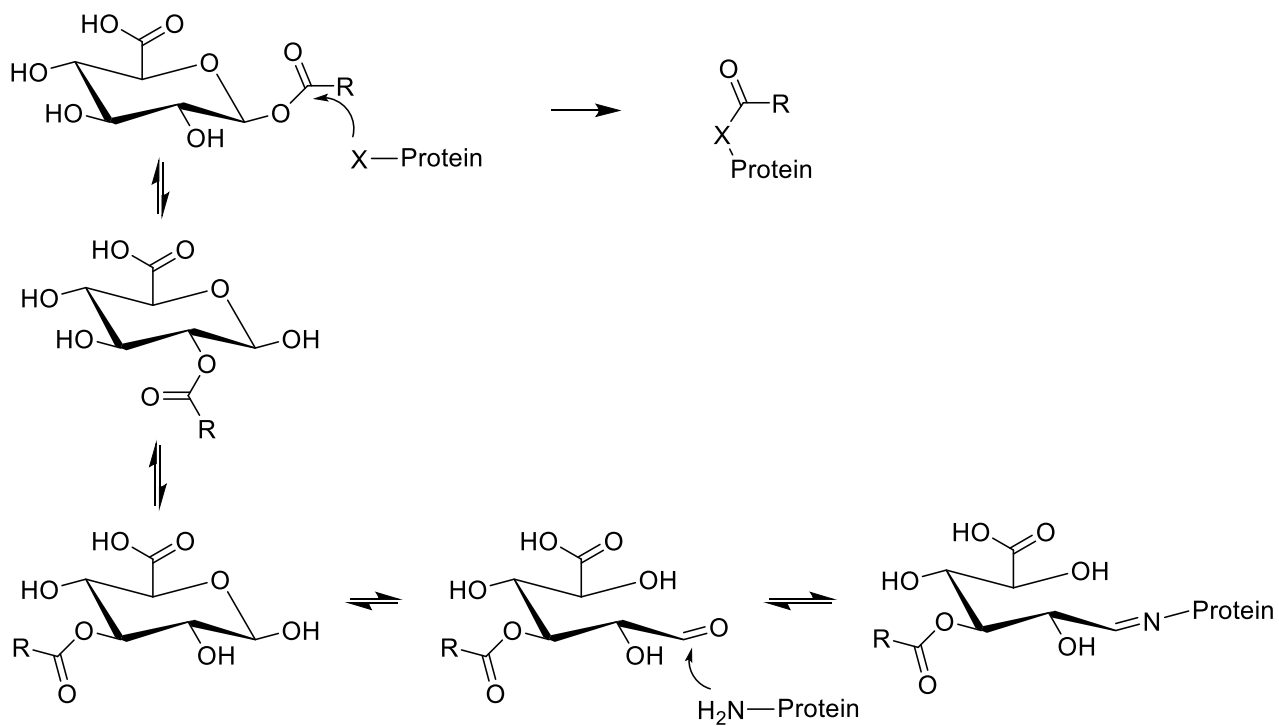


Figure 22. アシルグルクロニドの構造と共有結合性を示すメカニズム

Table 10. カルボン酸を有する薬物の投与量, アシルグルクロニドトラッピングアッセイ時のシステインアダクト生成量および親化合物の曝露量

Label	Name	Dose (mg)	Formation rate of	AUC	Formation rate × AUC
			Cys conjugate [pmol/mg/2 hr]	[ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ]	[pmol/mg/2hr × $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ]
Withdrawn	Ibufenac	4000	702	1780	1,250,128
Withdrawn	Fenclozic acid	300	495	2126	1,051,204
Withdrawn	TAK-875	50	196	44.2	8,682
Withdrawn	Benoxaprofen	1200	1,053	6036	6,353,514
Withdrawn	Zomepirac	600	2,333	2855	6,662,564
Warning	Ibuprofen	3200	162	915.2	147,953
Warning	Tolmetin	1800	1,185	312	369,787
Warning	Probenecid	1000	281	827	232,309
Warning	Gemfibrozil	1200	N.D.	125	N.C.
Warning	Febuxostat	60	511	12.1	3,098
Warning	Diclofenac	150	5,238	3.67	19,200
Warning	Mefenamic acid	1250	134	93.8	11,458
Warning	Indomethacin	200	2,153	30.6	65,845
Warning	Naproxen	1000	735	2652	2,021,060
Safe	Meclofenamate	400	N.D.	48.5	N.C.
Safe	Furosemide	80	220	7.18	1,576
Safe	Repaglinide	16	N.D.	0.367	N.C.

N.D. Not detected., N.C. Not calculated

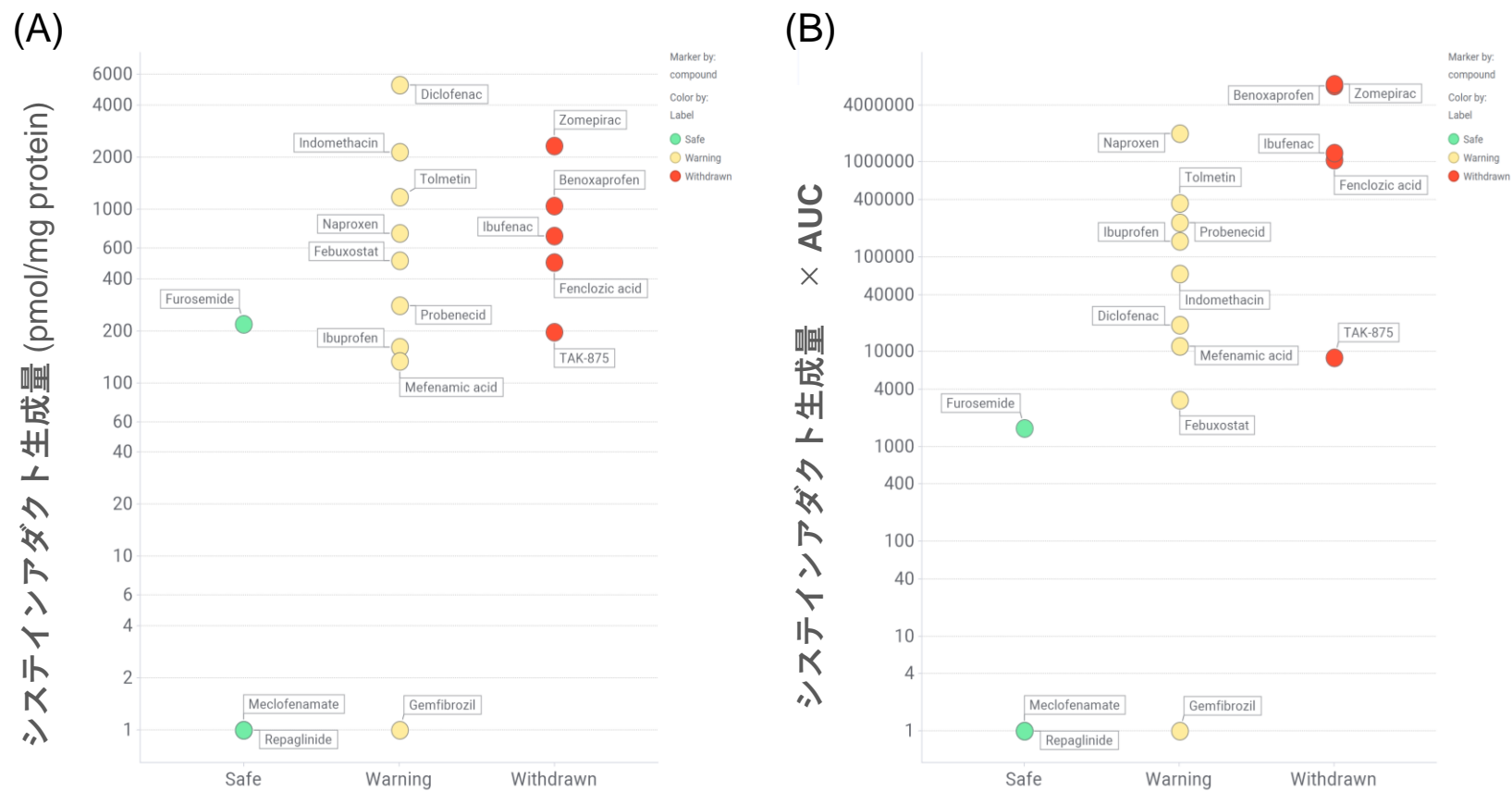


Figure 23. アシルグルクロニドトラッピングアッセイ時のアダクト生成量および AUC を乗じた値とリスク分類の関係

### 第三節 考察

本章では反応性代謝物の共有結合量あるいはシステインアダクト生成量と肝障害リスクとの関係性について検討を行った。反応性代謝物による毒性リスク評価は、*in vitro* ヒト肝ミクロソーム代謝試験における共有結合量 200 pmol/mg のクライテリア<sup>11</sup>や、一日投与量との相関<sup>32</sup>によるリスク予測が知られているが、経験則に由来する基準であることから生体への吸収率や全身クリアランスの影響により肝障害リスクを見誤る可能性が懸念される。例えば、NSAID として開発された sudoxicam は投与量が 50 mg/day、共有結合量が 35 pmol/mg/hr と比較的低い投与量と反応性にも拘らず、ヒトで重篤な肝障害を示したために開発中止となっている。Sudoxicam のクリアランスは非常に低く、その代謝に対する反応性代謝物生成に占める割合が大きいと想定され、投与量や共有結合量から想定されるよりも高い体内曝露量を示したものと考えられる。本研究では体内での反応性代謝物生成量に注目して解析を行ったため、予測精度が改善したものと考えられた。既存薬の RM burden を算出するにあっては、全身クリアランス ( $CL_{total}$ ) データ取得の難しさから  $F_g \times F_h = 1$  と仮定したことで消化管代謝あるいは肝代謝による初回通過効果が大きい薬物では、RM burden を過小に算出していることが考えられる。しかしながら、開発候補品の肝障害リスクを予測する場合にはヒトにおいて  $CL_{total}$  および  $f_a$  の予測値から算出することを想定しており、肝障害リスクを過小に評価する可能性は低く、開発しようとする薬物のリスクを過小評価する可能性は低いと考えられた。



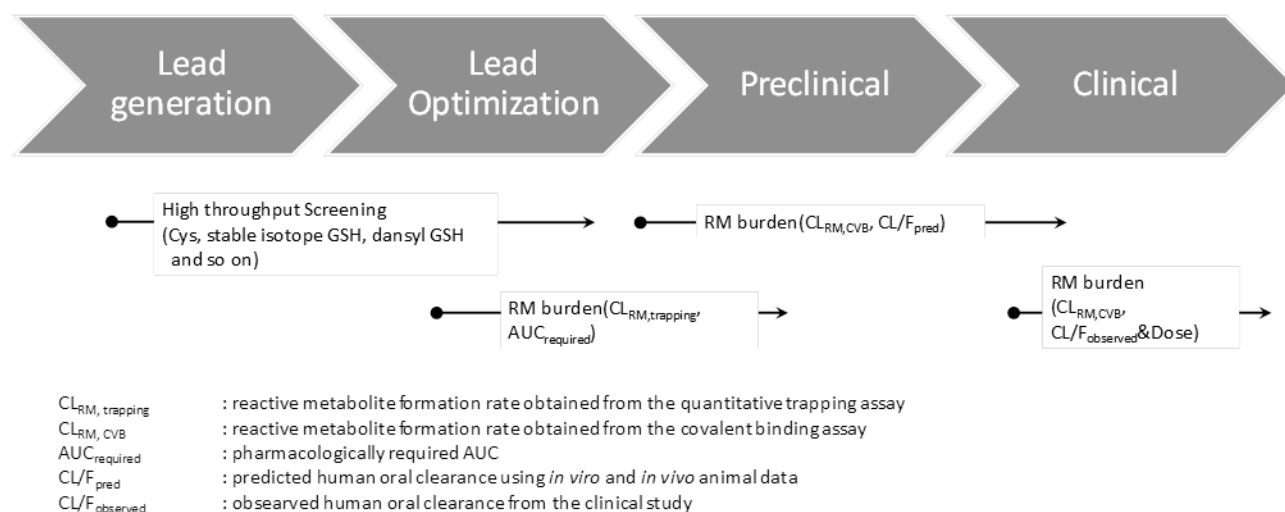


Figure 24. 創薬プロセスにおける段階的な RM burden による特異体質性薬物毒性リスク予測

第二相代謝反応により生じる反応性代謝物アシル CoA 抱合体およびアシルグルクロニドについてのリスク評価では、親化合物曝露を考慮することで臨床での肝障害リスク予測に相関がみられたものの、リスク分類では warning である ibuprofen が高い反応性を示した。Ibuprofen はラセミ体として開発されて使用されているが、その活性本体は (*S*)-ibuprofen でありアシル CoA シンテターゼによる代謝を受けず、一方で鏡像異性体である (*R*)-ibuprofen は異なる代謝を受けることが報告されている。すなわち (*R*)-ibuprofen から、(*R*)-ibuprofen アシル CoA 抱合体を生じた後、alpha-methylacyl-CoA racemase の働きによりメチル基の立体が反転して (*S*)-ibuprofen CoA 代謝物を生じる。更に加水分解を受けた結果として、立体反転した (*S*)-ibuprofen が生じる<sup>80</sup>。Racemase はミトコンドリアやペルオキシソームに局在しており、本研究で行ったヒト肝ミクロソーム反応液でのトラッピングアッセイでは、このような ibuprofen が受ける複雑な代謝を再現することができず、代謝反応を適切に評価できていない可能性が考えられた。第二章でシ

ステインがアシル CoA 抱合体の反応性を評価できることを新規に見出したが、その反応メカニズムから同様の手法でアシルグルクロニドを評価できると期待された。そこで、探索的にアシルグルクロニドのトラッピングアッセイを実施し、システインアダクト生成量を評価した。Diclofenac をアシル CoA トラッピングアッセイで評価した際に、システインアダクトが認められなかったが、アシルグルクロニドトラッピングアッセイで高い結合量を示した。いずれもカルボン酸に由来する代謝物であるが、毒性リスクを適切に評価するためには、アシル CoA 抱合体とアシルグルクロニドはそれぞれ評価する必要があることを示唆したと考えられた。システインアダクト生成量に加えて、親化合物 AUC を考慮することでそれぞれの毒性リスクの予測性に向上がみられたことから、第二相代謝反応により生じる反応性代謝物についても、親化合物の曝露量が毒性リスクに関与すると考えられた。

以上の結果から、第一相代謝反応・第二相代謝反応のいずれから生じる反応性代謝物においても、親化合物 PK パラメーターを考慮することで毒性リスク予測の精度が向上することを示した。反応性代謝物生成量を第一章・第二章で構築した F-NMR 定量や定量的トラッピングアッセイ評価により見積り、親化合物の曝露から生体内での反応性代謝物生成量を推定することで医薬品探索早期から定量的なリスク予測が可能であると期待される。

## 結論

医薬品開発の過程では、げっ歯類やサルやイヌを用いた毒性試験により安全性が評価される。しかしながら、反応性代謝物による毒性は代謝の種差や遺伝的要因等のために動物実験から予測することは難しく、上市後に広く投与されるようになってから毒性が認められる。このような毒性は服用患者に不利益を与えるばかりか、企業活動の観点からも開発費が回収できず大きな問題となる。そのため、反応性代謝物による毒性リスクを回避した薬物を創出することは非常に重要である。探索段階から早期に評価するため、本研究では RI 標識化合物を用いずに定量的に評価できる手法の確立、更に、得られた結果を用いて臨床における肝障害リスクを予測することを目指した。

第一章では、第一相代謝反応による反応性代謝物生成を定量的に評価する手法を検討した。医薬品の分子構造にしばしば使用されるフッ素原子を F-NMR により定量することで、放射性同位元素標識体を使用せず共有結合量を評価した。トリフルオロメチル基を有する flutamide で代謝物として構造変換したタンパクに共有結合した薬物由来のフッ素シグナルが定量可能であることを示した。更に幅広く酸化代謝物の評価するために $[^{35}\text{S}]$ システインおよび $[^{14}\text{C}]$ KCN を用いたトラッピングアッセイを構築し、得られたシステインアダクト生成量が共有結合量に相関することを示した。

第二章では、カルボン酸から生じるアシル CoA 抱合体の反応性について検討し、システインが安定なアダクトを形成することを新規に見出した。更にシステインアダクトが UV 吸収部位に構造変化を持たないことに注目し、極大吸収波長における UV エリアにより定量することで、 $[^{35}\text{S}]$ システインを用いた定量的なトラッピングアッセイと同等の値が得られることを示した。これまで検出すること

やリスク予測をすることが難しかったアシル CoA 抱合体について、RI 標識体を用いることなく評価することができる定量的評価を構築した。

第三章では、反応性代謝物による毒性リスクの予測について検討した。複数の薬物について、*in vitro* 実験値として共有結合量あるいはトラッピングアッセイにおけるアダクト生成量を収集・取得し、臨床 PK データを考慮することで毒性リスク予測の向上を目指した。先行報告より収集した 48 個の薬物のヒト肝ミクロソームへの共有結合量と臨床試験から得られた投与量および AUC から体内負荷量 (RM burden) を算出し、親化合物の暴露量を考慮することで毒性リスクの予測が大幅に向上することを示した。更に、第一相代謝反応による反応性代謝物については、トラッピングアッセイにより RM burden を同様に算出できると、第二相代謝反応によるアシル CoA 抱合体およびアシルグルクロニドについては、システインアダクト生成量と親化合物の曝露を乗じることで、毒性リスクと良好な相関があることを示した。

本研究では、反応性代謝物生成の定量的評価法および、ヒト生体内での反応性代謝物生成量を見積もることによる肝障害リスク予測法を確立した。これらの手法は、放射性同位元素標識体を必要とせずに評価が行うことが可能であり、またヒト PK パラメーター予測と組み合わせることで、医薬品探索段階から高い精度で特異体質性薬物毒性リスクを予測することができるため、より安全で効率的な医薬品開発について貢献することができるものと期待される。

## 謝辞

本論文の作成に際し，終始，教育的かつ科学的なご指導ご鞭撻を賜りました大阪医科薬科大学 大学院薬学研究科 臨床薬学教育研究センター 岩永 一範 教授に深く感謝するとともに厚く御礼申し上げます。

また，本論文の審査にあたり有益なご助言とご校閲を賜りました大阪医科薬科大学 薬剤学研究室 永井純也 教授，臨床薬学教育研究センター 中村 任 教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり，特段のご高配を賜りました日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所薬物動態研究所 野村 幸広 所長，谷口 寿生 副所長，伊東 惣一郎 副所長，小林 暁グループリーダー，七山 豊通 前グループリーダーに感謝いたします。

最後に，研究に専念できる時間を与えてくれるとともに，支えてくれた家族に心から感謝いたします。

## 実験の部

### 第一章の実験

#### 実験材料

ヒト肝ミクロソーム ( $n = 50$ , mixed gender) は, Sekisui XenoTech, LLC (Kansas City, KS, USA) から購入した。NADPH regeneration system は BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA) から購入した。1M 水酸化ナトリウム溶液 (NaOH) , アセトニトリル, リン酸二水素カリウム, リン酸水素二カリウム, トリクロロ酢酸およびシステインは 和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。flutamide, 重水 ( $D_2O$ ) および重アセトニトリルは Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から購入した。 $[^{35}S]$  システイン , Ultima FLO-M は PerkinElmer Life and Analytical Science (Boston, USA) から購入した。 $[^{14}C]$ KCN は American Radiolabeled Chemical Inc.(St. Louis, MO, USA) より購入した。3,5-bis(trifluoromethyl)phenol は東京化成工業 (Tokyo, Japan) から購入した。ギ酸, ジメチルスルホキシドおよびジエチルエーテルはナカライテスク (Kyoto, Japan) から購入した。Bradford protein assay kit は BIO-RAD (CA, USA) から購入した。XBridge BEH C18 Column ( $130\text{\AA}$ ,  $3.5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$ ), Oasis HLB 96-well plate および Sep-Pak tC18 96-well  $\mu$ Elution Plates は Waters Corporation (Milford, MA, USA)から購入した。

#### F-NMR による定量性の確認

Flutamide に対して,  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$  の内部標準物質として 3,5-bis(trifluoromethyl)phenol を含む重アセトニトリル/重水溶液 (7/3, v/v) を加えた後, 段階希釈して得た標準溶液を作成し, F-NMR 測定を実施した。Flutamide

について、それぞれ 50  $\mu$ M の DMSO 溶液を作成した後、内部標準物質を含む重アセトニトリル/重水溶液を添加した後、重水にて希釈し、<sup>1</sup>H-NMR 測定を実施した。

### ヒト肝ミクロソームを用いた共有結合試験

Flutamide を 10 mM の DMSO 溶液となるように調製した保存溶液を MeCN で希釈して試験に用いた。反応液濃度が 10  $\mu$ M flutamide, 1 mg/mL ヒト肝ミクロソーム, 100 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4), 1.3 mM NADP<sup>+</sup>, 3.3 mM グルコース 6-リン酸, 3.3 mM MgCl<sub>2</sub> および 0.45 units/mL グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼとなるように調製し、反応液総量は 10 mL で実施した。対照群として、NADPH 生成系の代わりに水を加えたヒト肝ミクロソーム液を調製した。それぞれの反応液を 37°C の水浴中で 1 時間インキュベートした後、2 倍量の MeCN を加えて反応停止し、遠心分離 (10,000rpm, 5min) した。得られた沈殿物を更に、10%トリクロロ酢酸含有 80%メタノール、メタノール/ジエチルエーテル (1/1, v/v), 80%メタノール水溶液でそれぞれ二回ずつ洗浄し、得られた沈殿を 400  $\mu$ L の 1 N NaOH を加えて加熱し、溶解させた。30  $\mu$ g/mL 3,5-bis(trifluoro)phenol を含む MeCN/重水 (7/3)溶液を 100  $\mu$ L 加え、溶液を遠心分離した上清についてタンパク濃度定量および <sup>1</sup>H-NMR 測定を実施した。

### 固相による未反応トラップ剤除去検討

固相の検討には、1 mg/mL ヒト肝ミクロソーム, 100 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4), [<sup>14</sup>C]KCN を 1mM となるように調製したヒト肝ミクロソーム液を用いた。混合液 200  $\mu$ L をそれぞれ OASIS HLB plate および Sep Pak tC18 plate にアプライし、複数回洗浄を行った後、アセトニトリルで溶出させた。洗浄液およ

び溶出液はシンチレーター (Ultima Gold) と混合し、液体シンチレーションカウンタ測定を実施した。条件設定後、改めて調製したアセトニトリル溶出液を用いて Radio-HPLC 測定を行った。

### **[<sup>35</sup>S]Cys および [<sup>14</sup>C]KCN トラッピングアッセイ**

10  $\mu$ M 被験物質, 1mg/mL ヒト肝ミクロソーム, 100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4), 1.3mM NADP<sup>+</sup>, 3.3mM グルコース 6-リン酸, 3.3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45 unit/mL グルコース 6-リン酸脱水素酵素に対して, 1mM [<sup>35</sup>S]Cys または [<sup>14</sup>C]KCN となるように調製し, 反応液量は 0.5 mL で実施した。対照試料として, 被験物質溶液の代わりにアセトニトリルを同量添加した反応液を調製した。37°C の水浴中で 1 時間インキュベートした後, Sep-pak tC18 に 200  $\mu$ L アプライし, 洗浄後のアセトニトリル溶出液の Radio-HPLC 測定を実施した。

### **分析条件**

#### **F-NMR 分析**

<sup>19</sup>F スペクトルは, 5 mm One NMR プローブを備えた Agilent 500 MHz DD2 NMR Spectrometer を用いて取得した。キャリア周波数は内部標準物質 3, 5-bis(trifluoromethyl)phenol と目的成分のシグナルの中間に設定した。スペクトルは手動で位相調整し, ベースライン補正を行い, 内部標準の 3,5-ビス (トリフルオロメチル) フェノール (-64.0 ppm) を基準として算出した。積算時間は 1 サンプルあたり最大 13 時間として測定を行った。

#### **Radio-HPLC 分析**

Radio-HPLC は, バイナリーポンプ, オートサンプラー, カラムオーブン, PDA



検出器を備えた Shimadzu Nexera X2 システムと、500  $\mu$ L フローセルを装着したオンライン放射能検出器 (Radiomatic 625TR, PerkinElmer Life and Analytical Science, Boston, MA, USA) にて実施した。分析カラムには Xbridge C18 BEH カラム (3.5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  150 mm) を用い、40°C にて、移動相 A : 0.1% ギ酸水溶液、移動相 B : 0.1% ギ酸含有 MeCN で分析を行った。グラジエント条件は、流速 1.0 mL/min にて、B 濃度 5% (0-5 min), 95% (5-35 min), 95% (35-40 min) で 1 測定あたり 40min の分析時間にて実施した。HPLC からの最初の 5 分間の溶出液は、切替バルブを通して廃棄した。液体シンチレーションカクテル (Ultima Flo-M) を HPLC からの溶出液に 3.0 mL/min の流速で混合し、 $^{14}\text{C}$  シンチレーション周期 ( $^{35}\text{S}$  とほぼ同じ  $\beta$  線エネルギー) をモニターすることで、放射能を測定した。得られた各サンプルのクロマトグラムをコントロールのクロマトグラムと比較し、また代謝物ピークを同定するために、LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて Full scan 分析を行った。

## データ解析

### F-NMR による共有結合と [ $^{35}\text{S}$ ]Cys による付加体形成速度の算出

F-NMR スペクトルで観測されたピークを積分し、共有結合の程度を以下のよう  
に算出した。

共有結合量 (pmol/h/mg protein) =

$$= \frac{\text{Fluorine concentration } (\mu\text{M})}{\text{Fluorine count (atom)}} \times \frac{1}{\text{Protein concentration (mg/mL)}} \times \frac{1 \text{ (L)}}{10^3 \text{ (mL)}} \\ \times \frac{10^6 \text{ (pmol)}}{1 \text{ } (\mu\text{mol})} \times \frac{1}{\text{Incubation time (h)}}$$

ラジオクロマトグラムで観察されたピークを積分し，得られたピーク面積を用いて，さらに以下のように計算した。

アダクト生成量 (pmol/hr/mg protein) =

$$= \frac{\text{ピークエリア (cpm)}}{\text{インジェクション量 (mL)}} \times \frac{1(\text{dps})}{60(\text{dpm})} \times \frac{1}{\text{計数効率 (cpm/dpm)}} \times \frac{1}{\text{比活性 (dps/pmol)}} \\ \times \frac{1(\text{mL})}{1(\text{mg prot.} \cdot \text{hr})} \times \frac{1}{\text{固相からの回収率}}$$

(計数効率および固相からの回収率は 100%として算出した。)

## 第二章の実験

### 実験材料

ヒト肝ミクロソーム (n = 50, mixed gender) は, Sekisui XenoTech, LLC (Kansas City, KS, USA) から購入した。Trizma 塩酸溶液 (pH 7.4, 1 M), マグネシウム溶液 (1 M), KCl, CoA, ATP, Triton X-100, ibufenac は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から購入した。アセトニトリル, グルタチオン, システイン及びリシンは富士フイルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。ジチオスレイトールは東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した。UGT reaction mix solution は Corning (Corning, NY, USA) より購入した。[<sup>35</sup>S]システインおよび Ultima Flo M は PerkinElmer Life and Analytical Science (Boston, MA, USA) から購入した。ギ酸およびジメチルスルホキシドは, ナカライテスク (Kyoto, Japan) から購入した。Acquity C18 BEH カラムと XBridge BEH C18 カラムは Waters Corporation (Milford, MA, USA) から購入した。

### トラップ剤を用いたアシル CoA 化合物の検出

グルタチオン，システインおよびリシンの 3 種類を検討した。反応液は 100  $\mu$ M ibufenac, 1 mg/mL ヒト肝ミクロソーム, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150 mM KCl, 15 mM  $MgCl_2$ , 3 mM ATP とトラップ剤 (5 mM GSH または 1 mM システイン) となるよう調製した。コエンザイム A (最終濃度: 0.4 mM) を添加して反応を開始し, 37°C の水浴でインキュベートした後, 2 倍量の氷冷アセトニトリルを加えて反応を終了させた。遠心分離後の上清を等量の水で希釈し, UPLC/SynaptG2 にて Full scan 測定を行った。

### アシル CoA 反応性のアッセイ条件の開発

100  $\mu$ M の被験物質, 1 mg/mL のヒト肝ミクロソーム, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150 mM KCl, 15 mM  $MgCl_2$ , 3 mM ATP となるように反応液を調製し, Triton X-100, alamethicin, DTT を添加時の影響を検討した。トラップ剤として 1 mM または 5 mM システイン及び 1mM リシンについても比較を行った。コエンザイム A (最終濃度: 0.5 mM) を添加して反応を開始し 37°C の水浴でインキュベートした後, 2 倍量の 10 mM DTT 含有氷冷アセトニトリルを加えて反応を終了させた。遠心分離後の上清を水で希釈し, UPLC/SynaptG2 にて Full scan 測定を行った。

### [<sup>35</sup>S]Cys トラッピングアッセイ

100  $\mu$ M 試験化合物, 1 mg/mL ヒト肝ミクロソーム, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150 mM KCl, 15 mM  $MgCl_2$ , 3 mM ATP, 0.5 mM CoA, 0.1% (w/v) Triton X-100, 1 mM DTT および 1 mM [<sup>35</sup>S] Cys (3.93 GBq/mmol) となるように反応

液を調製し、対照試料として、被験物質を含まないヒト肝ミクロソーム反応液を調製した。37°Cの水浴で4時間インキュベート後、10 mM DTTを含む氷冷アセトニトリルを加えて反応を停止させた。放射性同位体結合体は、アセトニトリルで繰り返し抽出した。抽出液を乾固し、非標識システインを含むアセトニトリル水溶液で再溶解し、Radio-HPLC測定を実施した。

### HPLC-MS 分析条件

HPLC-MS 分析は、Synapt G2 HDMS と接続した Waters UPLC システムを用いて行った。HPLC 分析は、酸性条件（移動相 A: 0.1% formic acid in water, B: 0.1% formic acid in MeCN）および中性条件（移動相 A: 5 mM ammonium formate in water, B: MeCN）で実施した。分析カラムには Acquity C18 BEH カラム（1.7  $\mu$ m, 2.1 mm  $\times$  50 mm）を用い、40°Cでグラジエント B 濃度 2%（0-0.4 分）、98%（0.4-7.0 分）、98%（7.0-7.55 分）、2%（7.55-7.6 分）及び 2%（7.6-8.4 分）で実施した。流速は 7.05-7.6 minを除き 0.5 mL/minで測定し、7.05-7.6minにおいては 0.80 mL/minとした。親化合物の最大吸収波長にてUVクロマトグラムを描画し、インキュベーションサンプル中のアダクトとイニシャルサンプルの親化合物をピーク面積比を評価した。MS 分析は、エレクトロスプレーイオン化モードのポジティブモードにて実施し、ソース温度 120°C、脱溶媒温度 600°C、コーンガス流量 50 L/hr、脱溶媒ガス流量 1200 L/hr、キャピラリー電圧 2.0 kV の設定条件で Full scan 測定および MSE 測定を実施した。

### Radio-HPLC 分析

$\beta$ -RAM 5 (LabLogic, Tampa, FL, USA) を搭載した Shimadzu Nexera X2 システムを用いて Radio-HPLC を実施した。分析カラムには Xbridge C18 BEH カラ

ム (3.5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  150 mm) を用い, 40°Cでグラジエント B 濃度 5% (0-5 分), 95% (5-35 分), 95% (35-40 分) (移動相 A : 水中 FA 0.1%, B : MeCN 中 FA 0.1% ) で流速 1.0 mL/min で 40min の分析を実施した。HPLC からの溶出液の最初の 5 分間分は, 未反応の [ $^{35}$ S]Cys を除去するため diverter valve で廃棄した。液体シンチレーションカクテル (Ultima Flo M) を HPLC からの溶出液に 3.0 mL/min の流速で混合し,  $^{14}$ C シンチレーション周期 ( $^{35}$ S とほぼ同じ  $\beta$  線エネルギー) をモニターすることで, 放射能を測定した。得られた各サンプルのクロマトグラムをコントロール群と比較した。また, アダクトピークの成分の m/z 取得のため, LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて Full scan 測定を実施した。

#### [ $^{35}$ S]Cys アダクト生成量の算出

[ $^{35}$ S]Cys アダクトの生成率は, 以下のように算出した。

[ $^{35}$ S]システインアダクト生成量 (pmol/mg protein/ 4hr) =

$$= \frac{\text{Radio - HPLC 上のピークエリア (cpm)}}{\text{インジェクション量 (mL)}} \times \frac{1(\text{dps})}{60(\text{dpm})} \times \frac{1}{\text{計数効率 (cpm/dpm)}} \\ \times \frac{1}{\text{比活性 (dps/pmol)}} \times \frac{1(\text{mL})}{1(\text{mg protein})}$$

(計数効率は 100% として, 算出した。)

## UV ピーク面積による Cys アダクト生成量の算出

Cys アダクト生成量は以下のように算出した。

システインアダクト生成量 (pmol/mg protein/ 4hr) =

$$= \frac{4 \text{ hr サンプルのシステインアダクト UV ピークエリア}}{\text{Initial サンプルの親化合物の UV ピークエリア}} \times 100 \mu\text{M} \times \frac{1 \text{ (mL)}}{1 \text{ (mg protein)}}$$

## 第三章の実験

### 実験材料

Tolmetin, repaglinide, furosemide, zomepirac, mefenamic acid, diclofenac は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から購入した ibuprofen, fenclozic acid, indomethacin, naproxen は富士フイルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。Meclofenamate, probenecid, gemfibrozil, febuxostat は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した。Benoxaprofen は, Tronto Research Chemicals (カナダ, オンタリオ州トロント) から購入した。TAK-875 は日本たばこ産業株式会社で合成された。そのほかの試薬は, 第二章で用いた試薬と同じものを使用した。

### アシル CoA トラッピングアッセイ

100  $\mu\text{M}$  の被験物質, 1 mg/mL のヒト肝ミクロソーム, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM ATP, 0.1% Triton X-100 (w/v), 1 mM DTT, 5 mM システインになるように調製し, コエンザイム A (最終濃度: 0.5 mM) を添加して反応を開始し 37°C の水浴で 2hr インキュベートした後, 2 倍量の 10 mM DTT 含有氷冷アセトニトリルを加えて反応を終了させた。遠心分離後の上清を水で希釈し, UPLC/SynaptG2 にて Fullscan 測定を行った。

### グルクロニドトラッピングアッセイ

100  $\mu$ M の被験物質，1 mg/mL のヒト肝ミクロソーム 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)，5 mM UDPGA，16 mM  $\text{MgCl}_2$ ，50  $\mu$ g/mL，1 mM DTT，5 mM システインになるように調製し反応を開始し 37°C の水浴でインキュベートした後，2 倍量の 10 mM DTT 含有氷冷アセトニトリルを加えて反応を終了させた。遠心分離後の上清を水で希釈し，UPLC/SynaptG2 にて Full scan 測定を行った。

## 参考文献

1. Meyer, U.A., Overview of enzymes of drug metabolism. J. Pharmacokinet. Biopharm., 5, 449-459 (1996).
2. Johnson, T.W., Gallego, R.A., and Edwards, M.P., Lipophilic efficiency as an Important Metric in Drug Design. J. Med. Chem., 61, 6401-6420 (2016).
3. Kalgutkar, A.S., and Soglia, J.R., Minimising the potential for metabolic activation in drug discovery. Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol., 1, 91-142 (2005).
4. Menon, K.V.N., Angulo, P., and Lindor, K.D., Severe cholestatic hepatitis from troglitazone in a patient with nonalcoholic steatohepatitis and diabetes mellitus. Am. J. Gastroenterol., 96, 1631-1634 (2001).
5. 藤本和則, トログリタゾンから学んだ肝毒性: *in vivo* から *in vitro* へ. 谷本学校 毒性質問箱, 22, 62-67 (2020).
6. Uetrecht, J., Idiosyncratic drug reactions: past, present, and future. Chem. Res. Toxicol., 21, 84-92 (2008).
7. Zhou, S., Chan, E., Duan, W., Huang, M., and Chen, Y.Z., Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. Drug Metab. Rev., 37, 41-213 (2005).
8. Chen, M., Borlak, J., and Tong, W., Predicting idiosyncratic drug-induced liver injury: some recent advances. Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol., 8, 721-72 (2016).
9. Park, B.K., Boobis, A., Clarke, S., Goldring, C.E.P., Jones, D., Kenna, J.G., Lambert, C., Lavery, H.G., Naisbitt, D.J., Nelson, S., Nicoll-Griffith, D.A.,



- Obach, R.S., Routledge, P., Smith, D.A., Tweedie, D.J., Vermeulen, N., Williams, D.P., Wilson, I.D., and Baillie, T.A., Managing the challenge of chemically reactive metabolites in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 10, 292-306 (2011).
10. Japan Pharmaceutical Manufacturers Association (JPMA), DATA BOOK 2023 (2023).
11. Reese, M., Sakatis, M., Ambroso, J., Harrell, A., Yang, E., Chen, L., Taylor, M., Baines, I., Zhu, L., Ayrton, A. and Clarke, S., An integrated reactive metabolite evaluation approach to assess and reduce safety risk during drug discovery and development. *Chem. Biol. Interact.*, 192, 60–64 (2011).
12. 井上宗宣, 構造式から眺める含フッ素医薬. *ファルマシア*, 50, 14-18 (2014).
13. Gillis, E.P., Eastman, K.J., Hill, M.D., Donnelly, D.J. and Meanwell, N.A., Applications of fluorine in medicinal chemistry. *J. Med.Chem.*, 58, 8315–8359 (2015).
14. Degnan, A. P., Chaturvedula, P. V., Conway, C. M., Cook, D. A., Davis, C. D., Denton, R., Han, X., Macci, R., Mathias, N. R., Moench, P., Pin, S. S., Ren, S. X., Schartman, R., Signor, L. J., Thalody, G., Widmann, K. A., Xu, C., Macor, J. E., and Dubowchik, G. M., Discovery of (R)-4-(8-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroquinazolin-3(4H)-yl)-N-(3-(7-methyl-1H-indazol-5-yl)-1-oxo-1-(4-(piperidin-1-yl)piperidin-1-yl)propan-2-yl)piperidine-1-carboxamide (BMS-694153): a potent antagonist of the human calcitonin gene-related peptide receptor for migraine with rapid and efficient intranasal exposure. *J. Med. Chem.*, 51, 4858–4861 (2008).

15. Darnell, M. and Weidolf, L., Metabolism of xenobiotic carboxylic acids: focus on coenzyme A conjugation, reactivity, and interference with lipid metabolism. *Chem. Res. Toxicol.*, 26, 1139–1155 (2013).
16. Hashizume, H., Fukami, T., Mishima, K., Arakawa, H., Mishiro, K., Zhang, Y., Nakano, M., and Nakajima, M., Identification of an isoform catalyzing the CoA conjugation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the evaluation of the expression levels of acyl-CoA synthetases in the human liver. *Biochem. Pharmacol.*, 183, 114303 (2021).
17. Cerny, M.A. Prevalence of Non-Cytochrome P450-Mediated Metabolism in Food and Drug Administration-Approved Oral and Intravenous Drugs: 2006–2015. *Drug Metab. Dispos.*, 44, 1246–1252 (2016).
18. Lee, S.S., Buters, J.T., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., and Gonzalez, F.J., Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *J. Biol. Chem.*, 271, 12063-12067 (1996).
19. Obach, R. S., Kalgutkar, A. S., Soglia, J. R., and Zhao, S. X., Can in vitro metabolism-dependent covalent binding data in liver microsomes distinguish hepatotoxic from nonhepatotoxic drugs? An analysis of 18 drugs with consideration of intrinsic clearance and daily dose. *Chem, Res. Toxicol.*, 21, 1814-1822 (2008).
20. Zhang, D., Luo, G., Ding, X. and Lu, C., Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta. Pharm. Sin. B.*, 2, 549–561 (2012).
21. Sakatis, M.Z., Reese, M.J., Harrell, A.W., Taylor, M.A., Baines, I.A., Chen, L., Bloomer, J.C., Yang, E.Y., Ellens, H.M., Ambroso, J.L., Lovatt, C.A., Ayrton,

- A.D., and Clarke, S.E., Preclinical strategy to reduce clinical hepatotoxicity using in vitro bioactivation data for >200 compounds. *Chem. Res. Toxicol.*, 25, 2067–2082 (2012).
22. Isin, E.M., Elmore, C.S., Nilsson, G.N., Thompson, R.A. and Weidolf, L., Use of radiolabeled compounds in drug metabolism and pharmacokinetic studies. *Chem. Res. Toxicol.*, 25, 532-542 (2012).
23. Brink, A., Pahler, A., Funk, C., Schuler, F and Schadt, S., Minimizing the risk of chemically reactive metabolite formation of new drug candidates: implications for preclinical drug design. *Drug Discov. Today*, 22, 751-756 (2017).
24. Liao, S., Ewing, N.P., Boucher, B., Materne, O., and Brummel, C.L., High-throughput screening for glutathione conjugates using stable-isotope labeling and negative electrospray ionization precursor-ion mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26, 659-669 (2012).
25. Soglia, J.R., Contillo, L.G., Kalgutkar, A.S., Zhao, S., Hop, C.E., Boyd, J.G. and Cole, M.J., A semiquantitative method for the determination of reactive metabolite conjugate levels in vitro utilizing liquid chromatography-tandem mass spectrometry and novel quaternary ammonium glutathione analogues. *Chem. Res. Toxicol.*, 19, 480-490 (2006).
26. Welte, H., Zhou, T., Mihajlenko, X., Mayans, O. and Kovermann, M., What does fluorine do to a protein? Thermodynamic, and highly-resolved structural insights into fluorine-labelled variants of the cold shock protein. *Sci. Rep.*, 10, 2640 (2020).
27. Berson, A., Wolf, C., Chachaty, C., Fisch, C., Fau, D., Eugene, D., Loeper, J.,

- Gauthier, J.C., Beaune, P. and Pompon, D, Metabolic activation of the nitroaromatic antiandrogen flutamide by rat and human cytochromes P-450, including forms belonging to the 3A and 1A subfamilies. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 265, 366-372 (1993).
28. Kang, P., Dalvie, D., Smith, E., Zhou, S., Deese, A. and Nieman, J.A, Bioactivation of flutamide metabolites by human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, 36, 1425-1437 (2008).
29. Evans, D. C., Watt, A. P., Nicoll-Griffith, D. A., and Baillie, T. A., Drug-protein adducts: an industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development. *Chem. Res. Toxicol.*, 17, 3–16 (2004).
30. Singh, R., Silva Elipe, M. V., Pearson, P. G., Arison, B. H., Wong, B. K., White, R., Yu, X., Burgey, C. S., Lin, J. H., and Baillie, T. A., Metabolic Activation of a Pyrazinone-Containing Thrombin Inhibitor. Evidence for Novel Biotransformation Involving Pyrazinone Ring Oxidation, Rearrangement, and Covalent Binding to Proteins. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 198-207 (2003).
31. Usui, T., Mise, M., Hashizume, T., Yabuki, M. and Komuro, S., Evaluation of the Potential for Drug-Induced Liver Injury Based on in Vitro Covalent Binding to Human Liver Proteins. *Drug Metab. Dispos.* 37, 2383-2392 (2009).
32. Nakayama, S., Atsumi, R., Takakusa, H., Kobayashi, Y., Kurihara, A., Nagai, Y., Nakai, D., and Okazaki, O., A zone classification system for risk assessment of idiosyncratic drug toxicity using daily dose and covalent binding. *Drug Metab. Dispos.* 37, 1970–1977 (2009).
33. Pearson, R.G., Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 3533-

3539 (1963).

34. Takakusa, H., Masumoto, H., Makino, C., Okazaki, O. and Sudo, K., Quantitative Assessment of Reactive Metabolite Formation using  $^{35}\text{S}$ -labeled Glutathione. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 24, 100-107 (2009).
35. Inoue, K., Shibata, Y., Takahashi, H., Ohe, T., Chiba, M. and Ishii, Y., A Trapping Method for Semi-quantitative Assessment of Reactive Metabolite Formation Using  $^{35}\text{S}$ -Cysteine and  $^{14}\text{C}$ -Cyanide. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 24, 245–254 (2011).
36. Rousu, T., Pelkonen, O. and Tolonen, A., Rapid detection and characterization of reactive drug metabolites in vitro using several isotope-labeled trapping agents and ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23, 843-855 (2009).
37. Liao, S., Ewing, N.P., Boucher, B., Materne, O. and Brummel, C.L., High-throughput screening for glutathione conjugates using stable-isotope labeling and negative electrospray ionization precursor-ion mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26, 659-669 (2012).
38. Jian, W., Liu, H. F., Zhao, W., Jones, E., and Zhu, M., Simultaneous Screening of Glutathione and Cyanide Adducts Using Precursor Ion and Neutral Loss Scans-Dependent Product Ion Spectral Acquisition and Data Mining Tools *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 23, 964–976 (2012).
39. Pfeiffer, C.M., Huff, D.L. and Gunter, E.W., Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting, *Clin. Chem.*, 45, 290-292 (1999).
40. Bergstrom, M.A., Isin, E.M., Castagnoli, N. and Milne, C.E., Bioactivation

- Pathways of the Cannabinoid Receptor 1 Antagonist Rimonabant. *Drug Metab. Dispos.*, 39, 1823–1832 (2011).
41. Hu, H., Katyayan, K.K., Czeskis, B.A., Perkins, E.J., Kulanthaivel, P., Comparison between radioanalysis and  $^{19}\text{F}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy in the determination of mass balance, metabolism, and distribution of pefloxacin. *Drug Metab. Dispos.*, 45, 399–408 (2017).
42. James, A.D., Marvalin, C., Luneau, A., Meissner, A. and Camenisch, G., Comparison of  $^{19}\text{F}$  NMR and  $^{14}\text{C}$  measurements for the assessment of ADME of BYL719 (alpelisib) in humans. *Drug Metab. Dispos.*, 45, 900–907 (2017).
43. Mutlib, A., Espina, R., Atherton, J., Wang, J., Talaat, R., Scatina, J. and Chandrasekaran, A., Alternate strategies to obtain mass balance without the use of radiolabeled compounds: application of quantitative fluorine ( $^{19}\text{F}$ ) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in metabolism studies. *Chem. Res. Toxicol.*, 25, 572–583 (2012).
44. Mandrioli, R., Albani, F., Casamenti, G., Sabbioni, C. and Raggia, M.A., Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of carbamazepine and five of its metabolites in plasma of epileptic patients. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci.*, 25, 109-116 (2001).
45. Feng, J., Wang, L., Dai, I., Harmon, T. and Bernert, J.T., Simultaneous Determination of Multiple Drugs of Abuse and Relevant Metabolites in Urine by LC-MS-MS. *J. Anal. Toxicol.*, 31, 359-368 (2007).
46. Gamoh, K. and Sawamoto, H., Determination of Cyanide Ion by High Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. *Anal. Sci.* 4, 665-666 (1988).

47. Bazargan, M., Foster, D.J.R., Davey, A.K. and Muhlhausler, B.S., Rosiglitazone Metabolism in Human Liver Microsomes Using a Substrate Depletion Method. *Drugs R D.*, 17, 189–198 (2017).
48. Mamidi, R.N.V.S., Dallas, S., Sensenhauser, C., Lim, H. K., Scheers, E., Verboven, P., Cuyckens, F., Leclercq, L., Evans, D. C., Kelley, M. F., Johnson, M. D., & Snoeys, J., In vitro and physiologically - based pharmacokinetic based assessment of drug–drug interaction potential of canagliflozin. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 83, 1082-1096 (2017).
49. Mašič, L.P., Role of cyclic tertiary amine bioactivation to reactive iminium species: structure toxicity relationship. *Curr. Drug Metab.*, 12, 35-50 (2011).
50. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER)., Safety Testing of Drug Metabolites Guidance for Industry (2020).
51. Mitra, K., Acyl Glucuronide and Coenzyme A Thioester Metabolites of Carboxylic Acid-Containing Drug Molecules: Layering Chemistry with Reactive Metabolism and Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.*, 35, 1777-1788 (2022).
52. Sawamura, R., Okudaira, N., Watanabe, K., Murai, T., Kobayashi, Y., Tachibana, M., Ohnuki, T., Masuda, K., Honma, H., Kurihara, A. and Okazaki, O., Predictability of idiosyncratic drug toxicity risk for carboxylic acid-containing drugs based on the chemical stability of acyl glucuronide. *Drug Metab. Dispos.*, 38, 1857–1864 (2010).
53. Boelsterli, U.A., Xenobiotic acyl glucuronides and acyl CoA thioesters as protein-reactive metabolites with the potential to cause idiosyncratic drug

- reactions. *Curr. Drug. Metab.*, 3, 439 – 450 (2002).
54. Grillo, M.P. and Benet, L.Z., Studies on the reactivity of clofibryl-S-Acyl CoA thioester with glutathione in vitro. *Drug Metab. Dispos.*, 30, 55-62 (2002).
  55. Sallustio, B. C., Nunthasomboon, S., Drogemuller, C. J., and Knights, K.M., In vitro covalent binding of nafenopin-CoA to human liver proteins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 163, 176–182 (2000).
  56. Shang, J., Tschirret-Guth, R., Cancilla, M., Samuel, K., Chen, Q., Chobanian, H.R., Thomas, A., Tong, W., Josien, H., Buevich, A.V. and Mitra, K., Bioactivation of GPR40 agonist MK-8666: formation of protein adducts in vitro from reactive acyl glucuronide and acyl CoA thioester. *Chem. Res. Toxicol.* 33, 191–201 (2020).
  57. Otieno, M.A., Snoeys, J., Lam, W., Ghosh, A., Player, M.R., Pocai, A., Salter, R., Simic, D., Skaggs, H., Singh, B., and Lim, H.K., Fasiglifam (TAK-875): mechanistic investigation and retrospective identification of hazards for drug induced liver injury. *Toxicol. Sci.*, 163, 374–384 (2018).
  58. Waybright, T.J., Britt, J.R. and McCloud, T.G., Overcoming problems of compound storage in DMSO: solvent and process alternatives. *J. Biomol. Screen.*, 14, 708-715 (2009).
  59. Easterbrook, J., Lu, C., Sakai, Y. and Li, A.P., Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.*, 29, 141-144 (2001).
  60. Isom, D.G., Castañeda, C.A., Cannon, B.R. and García-Moreno E, B., Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. *Proc. Natl. Acad.*



- Sci., 108, 5260-5265 (2011).
61. Fisher, M.B., Campanale, K., Ackermann, B.L., VandenBranden, M., and Wrighton, S.A., In vitro glucuronidation using human liver microsomes and the pore-forming peptide alamethicin. *Drug Metab. Dispos.*, 28, 560-566 (2000).
62. Popa-Burke, I. and Russell, J., Compound Precipitation in High-Concentration DMSO Solutions. *J. Biomol. Screen.*, 19, 1302-1308 (2014).
63. Thompson, R. A., Isin, E. M., Li, Y., Weidolf, L., Page, K., Wilson, I., Swallow, S., Middleton, B., Stahl, S., Foster, A. J., Dolgos, H., Weaver, R. and Kenna, J. G., In vitro approach to assess the potential for risk of idiosyncratic adverse reactions caused by candidate drugs. *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 1616-1632. (2012).
64. Gan, J., Ruan, Q., He, B., Zhu, M., Shyu, W. C. and Humphreys, W. G., In vitro screening of 50 highly prescribed drugs for thiol adduct formation comparison of potential for drug-induced toxicity and extent of adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.*, 22, 690-698 (2009).
65. Benet, L.Z and Sodhi, J.K., Investigating the Theoretical Basis for In Vitro-In Vivo Extrapolation (IVIVE) in Predicting Drug Metabolic Clearance and Proposing Future Experimental Pathways. *AAPS J.*, 10, 120 (2020).
66. Obach, R.S., Prediction of Human Clearance of Twenty-nine Drugs From Hepatic Microsomal Intrinsic Clearance Data: An Examination of in vitro Half-life Approach And Nonspecific Binding to Microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, 27, 1350-1359 (1999).
67. Barbhuiya, R.H., Dandekar, K.A. and Greene, D.S., Pharmacokinetics, Absolute Bioavailability, And Disposition Of [<sup>14</sup>C]Nefazodone In Humans.

- Drug Metab. Dispos., 24, 91-95 (1996).
68. Boik, J.C. and Newman, R.A., Structure-activity models of oral clearance, cytotoxicity, and LD50: a screen for promising anticancer compounds. *BMC Pharmacol.*, 8, 12 (2008).
  69. Durand, A., Thenot, J.P., Bianchetti, G. and Morselli, P.L., Comparative Pharmacokinetic Profile of Two Imidazopyridine Drugs: Zolpidem and Alpidem. *Drug Metab. Rev.*, 24, 239-266 (1992).
  70. Gasser, T.C., Ebert, S.C., Graversen, P.H. and Madsen, P.O., Ciprofloxacin Pharmacokinetics in Patients with Normal and Impaired Renal Function. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31, 709-712 (1987).
  71. Kerremans, A.L.M., Gnbau, F.W.J., Tan, Y. and Gmneken, C.A.M., Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Studies of Tienilic Acid in Healthy Volunteers. *Eur. J. C. Im. Pharmacol.*, 22, 515-521 (1982).
  72. Li, L.J., Shang, D.W., Li, W.B., Guo, W., Wang, X.P., Ren, Y.P., Li, A.N., Fu, P.X., Ji, S.M., Lu, W. and Wang, C.Y., Population pharmacokinetics of clozapine and its primary metabolite norclozapine in Chinese patients with schizophrenia. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 33, 1409–1416 (2012).
  73. Mather, L.E., Austin, K.L. and Philpot, C.R. and Mcdonald, P.J., Absorption And Bioavailability Of Oral Erythromycin. *Br. J. Clin. Pharmac.*, 12, 131-140 (1981).
  74. Ward, K.W. and Smith, B.R., A Comprehensive Quantitative and Qualitative Evaluation of Extrapolation of Intravenous Pharmacokinetic Parameters From Rat, Dog, and Monkey to Humans. I. Clearance. *Drug Metab. Dispos.*, 32, 603-611 (2004).

75. Wiseman, E.H. and Chiaini, J., Anti-inflammatory and pharmacokinetic properties of sudoxicam N-(2-thiazolyl)-4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide 1,1-dioxide. *Biochem. Pharmacol.*, 21, 2323-2334 (1972).
76. Uetrecht, J.P., New Concepts in Immunology Relevant to Idiosyncratic Drug Reactions: The “Danger Hypothesis” and Innate Immune System. *Chem. Res. Toxicol.*, 12, 387-395 (1999).
77. Lassila, T., Hokkanen, J., Aatsinki, S. M., Mattila, S., Turpeinen, M. and Tolonen, A., Toxicity of Carboxylic Acid-Containing Drugs: The Role of Acyl Migration and CoA Conjugation Investigated. *Chem. Res. Toxicol.*, 28, 2292-2303 (2015).
78. Naritomi, Y., Nakamori, F., Furukawa, T. and Tabata, K., Prediction of hepatic and intestinal glucuronidation using in vitro-in vivo extrapolation. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 30, 21-29 (2015).
79. Zhong, S., Jones, R., Lu, W., Schadt, S. and Ottaviani, G., A New Rapid In Vitro Assay for Assessing Reactivity of Acyl Glucuronides. *Drug Metab. Dispos.*, 43, 1711-1717 (2015).
80. Gliszczyńska, A. and Sánchez-López, E., Dexibuprofen Therapeutic Advances: Prodrugs and Nanotechnological Formulations. *Pharmaceutics.*, 13, 414 (2021).
81. Chalmers, T.M., Pohl, J.E.F., and Platt, D.S., Evaluation in man of fenclozic acid (I.C.I. 54,450:Myalex), a new anti-inflammatory agent. I. Serum concentration studies in healthy individuals and in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 28, 590–594 (1969).
82. Chatfield, D.H., Tarrant, M.E., Smith, G.L., and Speirs, C.F., Pharmacokinetic

- studies with benoxaprofen in man: prediction of steady-state levels from single-dose data. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 4, 579–583 (1977).
83. Matsuki, Y., Fukuhara, K., Dan, J., and Nambara, T., Pharmacokinetic studies of meclomen in human volunteers with single and consecutive oral administrations. *Yakubutsudoutai.* 3, 237–249. Japanese (1988).
84. Nagatomi, H., Yamamoto, M., and Kuwano, S., Initial plasma concentrations and clinical evaluation of 2,3-nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Indomethacin, ibufenac). *The Japanese Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 45, 2049–2052 (1968).
85. Naik, H., Vakilynejad, M., Wu, J., Viswanathan, P., Dote, N., Higuchi, T., and Leifke, E., Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamic properties of the GPR40 agonist TAK-875: results from a double-blind, placebo-controlled single oral dose rising study in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 52, 1007–1016 (2012).

## 論文目録

1.Nobuyuki Kakutani, Takahiro Iwai, Yasushi Ohno, Satoru Kobayashi, Yukihiro Nomura.

Evaluation of covalent binding of flutamide and its risk assessment using  $^{19}\text{F}$ -NMR.

Xenobiotica. 51:88-94 (2021).

2.Nobuyuki Kakutani, Satoru Kobayashi, Toshio Taniguchi, Yukihiro Nomura.

A cysteine trapping assay for risk assessment of reactive acyl CoA metabolites.

Xenobiotica. 52:16-25 (2022).

3.Nobuyuki Kakutani, Toyomichi Nanayama, Yukihiro Nomura.

Novel risk assessment of reactive metabolites from discovery to clinical stage

Journal of toxicological sciences. 44:201-211 (2019).