

氏 名	まつ 松 おか 岡 まさ 正 ゆき 之
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 595 号
学位授与の日付	平 成 10 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	ペネム系抗生物質の新規分析法の開発と体内動態評価への応用

(主査)

論文調査委員 教授 中川照眞 教授 高倉喜信 教授 半田哲郎

論 文 内 容 の 要 旨

医薬品開発における生体内動態に関する研究は、その有効性ならびに安全性に密接に関連する分野である。特に、抗生物質や抗菌剤を開発する場合、その吸収、分布、代謝、排泄などの生体内での挙動を把握することは、薬理学的特性、即ち薬効および毒性の発現を解明する上で極めて重要となる。また、不斉炭素を有する場合は、光学異性体間で活性が異なることがあり、それぞれの異性体について、体内動態を解明することが必須となる。したがって、前臨床試験および臨床試験を通して直接薬理効果の指標となりうる生体組織内の薬物濃度を、前処理操作中における試料の分解を防ぎ、高感度、特異的かつ定量的に測定する方法を確立する必要がある。

本研究の対象とした薬物はritipenem acoxil (RIPM-AC) およびtemafloxacin (TMFX) である。前者は、世界で初めて臨床使用されたペネム系の新規経口抗生物質であり、後者はニューキノロン系合成抗菌剤である。

本研究は、RIPM-ACの体内動態を精度よく評価するために、高感度化、迅速化を目的に新たな分析化学的手法の開発を中心に展開したものである。さらに、TMFXについては光学異性体の新規分離分析法を開発し、立体選択的に体内動態を明らかにした。

まず、RIPM-ACの活性本体のritipenem (RIPM) が血漿および尿中で不安定であることから、生体試料中における安定化法について研究した。その結果、1 M 3-(N-モルホリノ) プロパンスルホン酸 (MOPS) 溶液 (pH5.0) ・エチレングリコール (EG) 混液 (1 : 1) の添加が有効であることを見いだした。

次に、生体試料の前処理法として、従来から報告されている限外ろ過膜を用いる方法やバイオアッセイ法の欠点を解決するため、この種の抗生物質の分野では初めて溶媒抽出を用いるHPLC法を開発した。この方法は、極性が高く、分解しやすい活性代謝物のRIPMを生体試料中から選択的かつ高収率で液・液抽出でき、バイオアッセイ法に比べて特異性に優れ、かつ限外ろ過膜を用いて前処理するHPLC法に比べて定量感度が5～10倍高い特徴があった。また、クロマトグラム上のピークテリングやリーディング現象をなくすために、試料溶液の両側を1 Mリン酸塩緩衝液で挟み込む新規な注入法について検討を加え、分離性および理論段数の高いピークを得ることに成功した。この方法を適用することによって、従来法では評価できなかった50ng/mL以下の低濃度についても再現性よく定量可能となり、RIPM-ACの体内動態を精度よく評価できた。

RIPM-ACの代謝研究の一環として、RIPM自身の代謝物としてβ-ラクタム環が開環することによって生成するジカルボン酸 (P1) とそのジアステレオマー (P2) の分析研究を、またRIPM-ACのエステル側鎖の代謝物として、アセトキシメチルエステルが加水分解して生成したホルムアルデヒド、および同時に生成する酢酸が生体内のカルニチンと縮合して生成したアセチルカルニチンの分析法を開発した。P1およびP2については、分析用標品の入手が困難であったため、RIPMを一定条件下でアルカリ加水分解して生成したP1およびP2を標準溶液として用いた。このP1およびP2はRIPMに比べて極性が高く有機溶媒で抽出されないため、新たに限外ろ過膜で前処理後、分析カラムとして粒子径2 μmの充填剤を用いる迅速HPLC法を開発した。その結果、生体試料中の夾雑物の影響を受けることなく、汎用の分析カラム (粒子径: 5 μm)

に比べて約112の時間で分析可能となった。この方法をイヌ血漿中濃度測定に適用した結果、代謝物のP1とRIPMは投与量比例性を示し、RIPM-ACが線形の薬物速度論的特性を示すことを明らかにした。

一方、RIPM-ACのエステル側鎖の代謝産物であるホルムアルデヒドおよびアセチルカルニチンについては、1, 3-シクロヘキサジオンおよび1-アミノアントラセンをそれぞれ蛍光誘導体化試薬として用いる高感度かつ新規な蛍光-HPLC法を確立した。これらの測定法をRIPM-AC投与後の動物およびヒトにおける動態学的研究に応用した結果、ホルムアルデヒドおよびアセチルカルニチンの濃度はいずれも内因性の濃度範囲で推移し、薬物投与による濃度上昇は見られないことを明らかにした。

次に、TMFXのラセミ体を対象に、その光学異性体(R, S)の分離分析法を詳細に研究し、ジアステレオマーに導いて分離する間接法と光学活性な固定相で分離する直接法を新たに開発し、両方法間の利便性と特異性について研究した。間接法ではTMFXのラセミ体をメチルエステルとした後、光学活性な試薬であるS(-)-N-1-(2-ナフチルスルホニル)-2-ピロリジンカルボニルクロリドでジアステレオマーに導き、シリカゲルカラムで分離するHPLC法を、直接法ではカルボン酸をカルボニルアミドに、2級アミンをアセチル化に誘導体化後、光学活性な固定相(Ultrahel ES-OVM)で分離するHPLC法をそれぞれ開発し、本薬物の立体選択的体内動態を研究した。その結果、両方法間の定量精度にはほとんど差が認められないものの、間接法の分離度が0.73、直接法が1.89となり、後者の方が分離に優れ、かつ分析時間が約2/3となる迅速定量が可能となった。直接法を用いてヒトにおけるR, S体の体内動態を評価した結果、光学異性体間ではほぼ同等の挙動を示すことが明らかになった。

以上の基礎的および応用的研究は、RIPM-ACとTMFXの開発推進に大きく貢献すると共に、生体試料中で不安定な医薬品の分析並びに光学異性体医薬品の分離分析法として広く応用が期待できるものである。

論文審査の結果の要旨

医薬品開発における分布、代謝、排泄などの生体内動態に関する研究は、薬理学的特性、即ち薬効および毒性の発現を解明し、その有効性ならびに安全性を確保する上で極めて重要である。また、医薬品分子が不斉炭素を有する場合には、光学異性体間で活性が異なることがあるので、それぞれの異性体について体内動態を解明することが必須となる。従って、前臨床および臨床試験を通して直接薬理効果の指標となりうる生体組織内の薬物濃度を、前処理操作中における試料の分解を防ぎ、高感度、特異的かつ定量的に測定する方法を確立する必要がある。

本研究の対象とした薬物は、世界で初めて臨床使用されたペネム系新規経口抗生物質であるritipenem acoxil (RIPM-AC)ならびにニューキノロン系合成抗菌剤のtemafloxacin (TMFX)である。本研究は、RIPM-ACおよび代謝物の高感度化、迅速化を目的に新たな分析化学的手法の開発と体内動態の評価、ならびにTMFX光学異性体の新規分離分析法の開発と立体選択的体内動態について新しい知見を得たものである。

まず、RIPM-ACの活性本体であるritipenem (RIPM)が血漿および尿中で不安定であることから、生体試料中における安定化法について研究し、1 M 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)溶液(pH5.0)・エチレングリコール(EG)混液(1:1)の添加が有効であることを見いだした。次に、生体試料の前処理法として、従来から報告されている限外ろ過膜を用いる方法やバイオアッセイ法の欠点を解決するために、この種の抗生物質の分析法では初めて有機溶媒で抽出するHPLC法を開発した。この方法は、極性が高く、分解しやすいRIPMを生体試料中から選択的かつ高収率で抽出できる特徴があった。本法を適用することによって、血清から喀痰への移行率は約10%であることが分かり、RIPM-ACの体内動態を精度よく評価できた。

RIPM-ACの代謝研究の一環として、RIPM自身の代謝物としてβ-ラクタム環が開環することによって生成するジカルボン酸(P1)とそのジアステレオマー(P2)の分析研究を、またRIPM-ACのアセトキシメチル基が加水分解して生成したホルムアルデヒド、および同時に生成する酢酸が生体内のカルニチンと縮合して生成したアセチルカルニチンの分析法を開発した。分析用標品の入手が困難であったP1およびP2は、RIPMをアルカリ溶液で加水分解して用い、新たに限外ろ過膜で前処理後、粒子径2 μmの分析カラムを用いる迅速HPLC法を開発した。この方法をイヌ血漿中濃度測定に適用した結果、P1とRIPMは投与量比例性を示し、RIPM-ACが線形の薬物速度論的特性を示すことを明らかにした。一方、ホルムア

ルデヒドおよびアセチルカルニチンについては、1, 3-シクロヘキサジオンおよび1-アミノアントラセンをそれぞれ蛍光誘導体化試薬として用いる高感度かつ新規なHPLC法を確立した。これらの測定法をRIPM-AC投与後の動物およびヒトにおける動態学的研究に応用した結果、血漿中ホルムアルデヒドおよびアセチルカルニチンの濃度はいずれも内因性の濃度範囲で推移し、薬物投与による濃度上昇は見られないことを明らかにした。

次に、TMFXのラセミ体を対象に、その光学異性体(R, S)の分離分析法として、光学活性な試薬であるS(-)N-1-(2-ナフチルスルホニル)-2-ピロリジンカルボニルクロリドでジアステレオマーに導いて分離する間接HPLC法、およびカルボン酸をカルボニルアミドに、2級アミンをアセチル化に誘導体化後、光学活性な固定相で直接光学分離するHPLC法をそれぞれ開発し、本薬物の立体選択的体内動態を研究した。分離性および迅速性の面で優れた直接法を用いてヒトにおけるR, S体の体内動態を評価した結果、光学異性体間でほぼ同等の挙動を示すことが明らかになった。

以上の基礎的および応用的研究は、RIPM-ACとTMFXの開発推進に大きく貢献すると共に、今後、生体試料中で不安定な医薬品の分析並びに光学異性体医薬品の分離分析法として広く応用が期待できるものと考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値のあるものと認める。

さらに、平成10年9月4日論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果優秀と認定した。