

博士論文

Clenbuterol のラットにおける体内動態の光学特異性

Enantioselective disposition of clenbuterol in rats

金沢大学大学院自然科学研究科

生命科学専攻

分子作用学講座

学 籍 番 号 0923032520

氏 名 廣澤 伊織

主任指導教員名 石崎 純子

Clenbuterol is a long-acting β_2 -adrenoceptor agonist, but the desired activities reside almost exclusively in the (-)-*R*-enantiomer. Here, I examined enantioselectivity in the disposition of clenbuterol following administration of clenbuterol racemate to rats.

Concentrations of clenbuterol enantiomers in biological fluids were determined by LC-MS/MS assay with a Chirobiotic T column. This method was confirmed to show high sensitivity, specificity, and precision, and clenbuterol enantiomers in 0.1-mL volumes of plasma were precisely quantified at concentrations as low as 0.25 ng/mL. The pharmacokinetic profiles of clenbuterol enantiomers following intravenous administration of clenbuterol racemate (2 mg/kg) in rats were significantly different. The distribution volume of (-)-*R*-clenbuterol (9.17 ± 2.76 L/kg, mean \pm SD, $n = 4$) was significantly higher than that of (+)-*S*-clenbuterol (4.14 ± 1.00 L/kg). Total body clearance of (-)-*R*-clenbuterol (13.5 ± 1.8 mL/min/kg) was significantly higher than that of the (+)-*S*-enantiomer (11.5 ± 2.7 mL/min/kg). Urinary clearance was the same for the two enantiomers, but biliary excretion of (-)-*R*-clenbuterol (1.62 ± 0.88 mL/min/kg) was higher than that of the (+)-*S*-enantiomer (0.45 ± 0.23 mL/min/kg). The fractions of free (non-protein-bound) (-)-*R*- and (+)-*S*-clenbuterol in rat plasma were 48.8 ± 3.1 %, and 33.1 ± 1.5 %, respectively. These results indicated that there are differences in distribution and excretion of the clenbuterol enantiomers, and these may be predominantly due to enantioselective protein binding.

【序論】

Clenbuterol (4-amino- α -[(*tert*-butylamino)methyl]-3,5-dichlorobenzyl alcohol) (以下 CLN) は、選択的アドレナリン β_2 受容体刺激薬であり、作用時間が長い特徴を持つ、気管支喘息、慢性気管支炎、肺気腫、急性気管支炎および腹圧性尿失禁に適応がある内服薬であり、これら適応の作用機序はいずれも β_2 受容体刺激作用によるものである。

この Clenbuterol は一对の光学異性体を有するが、(-)-*R*-clenbuterol (以下 *R*-CLN) と (+)-*S*-clenbuterol (以下 *S*-CLN) が 50 : 50 の混合物であるラセミ体 (以下 (*rac*)-CLN) として市販されている。光学異性体は、物理的・化学的に等しいにもかかわらず、旋光性の違いにより生体に及ぼす作用や体内動態が異なることがある。CLN は、 β_2 受容体刺激作用による気管支拡張作用や子宮筋弛緩作用は *R*-CLN によるが、*S*-CLN にはそのような作用はほとんどなく、血圧低下やグルココルチコイドの上昇、血糖値の増加などの副次的な作用を持つ。しかし、各々の異性体の体内動態に関する情報はほとんどない。期待する薬理効果を持つ異性体に比べ、副作用を示す異性体のほうが体内での濃度が高くなる場合、求める薬理効果より副作用が強く現れる恐れがある。このような場合、光学分割することが必要となる。このため、異性体ごとの体内動態を明らかにすることは重要である。そこで本研究では、より安全性の高い投与方法を考慮するため、CLN の体内動態の光学特異性を明らかにすることを試みた。

光学異性体薬物の体内動態を明らかにするためには、光学分割した測定方法が必要となる。特に小動物を用いる場合、採取できる試料の量も限られる。CLN は多くの測定方法が報告されているが、それらはラセミ体としての測定法である。光学分割した測定方法を示したものは少なく、測定限界が 10 nmol/mL (cu. 2.77 μ g/mL) と感度が低い。そこで、小動物における CLN 光学異性体の体内動態の検討に有用な低濃度が検出可能とされる測定方法として、LC-MS/MS を用いた生体内中の CLN 異性体の測定法の確立を行った。また、*in vitro* および *in vivo* における CLN 光学異性体の相互変換の有無について検討した。さらに、ラット

における(*rac*)-CLN を静脈内および十二指腸内投与した後の、2 つの光学異性体の体内動態パラメータの算出、および吸収、分布および排泄について CLN 未変化体の動態について検討を行った。

【結果・考察】

1. 血漿中 CLN 光学異性体の定量法の開発

光学分割カラムとして、CHIROBIOTIC™ T (ASTEC, NJ) を用いた。より低濃度を検出するため、質量分析器 (MS/MS) を用いたところ、本測定法の定量下限は CLN 各異性体共に 0.25 ng/mL であり、*R*- および *S*-CLN を良好に分離できた。検量線は 0.25-50 ng/mL の範囲において直線性を示し、*R*- および *S*-CLN の相関係数 (R^2) は 0.9999 および 0.9998 であった。さらに、inter-assay variation における CV 値は、*R*-CLN が 1.4~3.6%、*S*-CLN が 1.3~3.2% の範囲内であった。Intra-assay における CV 値は、*R*-CLN が 1.0~4.3%、*S*-CLN が 1.4~3.2% の範囲内であった。このことから、本研究において確立した測定法の再現性は良好であると考えられる。本測定法は CLN 異性体の測定に十分適応できると考えられた。

2. *In vitro* および *in vivo* における CLN 光学異性体の相互変換に関する検討

CLN 光学異性体の *in vitro* における相互変換の有無と安定性について調査した。リン酸緩衝液 (PBS、pH 7.4) およびラット血漿中において、37°C で 72 時間インキュベートを行った。*R*- および *S*-CLN 濃度は、いずれも減少することなくほぼ一定値を示し、いずれの条件下においても、相互変換や分解は起こらないことが示された。

アドレナリン β_2 受容体刺激薬に共通しているベンジル位の 2 級アルコール部分は、酸性条件下で相互変換することが知られている。そこで、強酸性および強塩基性条件下における CLN の安定性および相互変換について検討した。まず、*S*-CLN に強酸性条件下として 1M HCl 水溶液を作用させたところ、24 時間でラセミ状態となり、強酸性条件下では相互変換することが示された。一方、*S*-CLN に強塩基性条件として 0.1M NaOH 水溶液を作用させ

たが、相互変換は認められなかった。しかし、強酸性および強塩基性いずれの条件下においても、24 時間で CLN の総量が 62% および 76% に減少していることから、これらの条件下では、物性として不安定であることが示された。

次に、*in vivo* における相互変換の検討のため、*R*-CLN をラットに経口投与したところ、投与後 0~72 時間の間、血漿中に対掌体である *S*-CLN は観測されなかった。したがって、ラットに経口投与後 72 時間の間、CLN の相互変換は起こらないことが示唆された。また、投与後 24 時間の間、尿中においても対掌体は観測されなかった。この結果は、先の強酸性条件下において CLN は相互変換が起こるという結果に反するものであったが、その要因として、経口投与した際、CLN の胃内滞留時間が短く、相互変換するのに十分な胃酸暴露がなかったためと考えられた。

3. CLN のラットにおける体内動態の光学特異性

(*rac*)-CLN をラットへ投与後の血漿中、尿中、および胆汁中濃度を測定し、各異性体の動態学的パラメータを算出した。(*rac*)-CLN 2 mg/kg を静脈内投与後、投与初期から 9 時間までの血漿中濃度は *S*-CLN が高く推移し、投与後 12 時間以降では *R*-CLN が高く推移した (Fig. 1)。*R*- および *S*-CLN の $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ は、それぞれ $1.25 \pm 0.18 \mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{mL}$ 、および $1.51 \pm 0.35 \mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{mL}$ と算出され、異性体間で有意な差は認められなかった。一方、*R*-CLN の全身クリアランス (CL_{tot}) は $13.5 \pm 1.8 \text{ mL}/\text{min}/\text{kg}$ であり、*S*-CLN : $11.5 \pm 2.7 \text{ mL}/\text{min}/\text{kg}$ よりも大きかった。*R*-CLN の分布容積 (V_{dss}) は $9.17 \pm 2.76 \text{ L}/\text{kg}$ であり、*S*-CLN : $4.14 \pm 1.00 \text{ L}/\text{kg}$ よりも有意に大きかった (Table 1)。

(*rac*)-CLN 2 mg/kg を静脈内投与後の尿中未変化体排泄量を測定したところ、*R*- および *S*-CLN の 24 時間排泄率は $19.7 \pm 1.2\%$ および $22.3 \pm 1.5\%$ であり、*S*-CLN の方が有意に

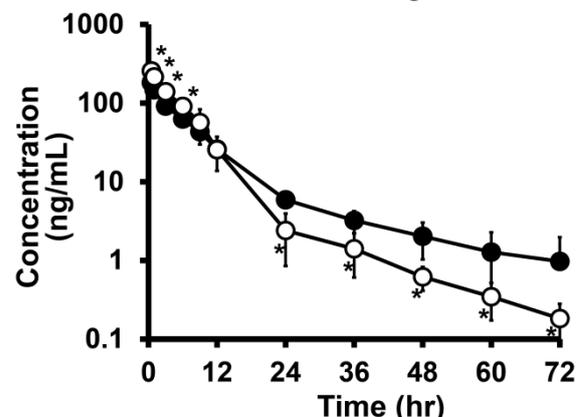


Fig.1. Plasma concentration versus time curves for (-)-*R*-clenbuterol (closed circles) and (+)-*S*-clenbuterol (open circles) after i.v. administration of 2 mg/kg (*rac*)-clenbuterol to rats. (n = 4, Mean \pm S.D.) * $p < 0.05$, (-)-*R*-clenbuterol vs. (+)-*S*-clenbuterol.

高かったが、腎クリアランスは 4.9 ± 0.7 mL/min/kg および 4.5 ± 0.9 mL/min/kg と有意な差は見られなかった。また、胆汁中未変化体排泄量を測定したところ、排泄率は *R*-CLN $7.7 \pm 1.8\%$ および *S*-CLN $3.3 \pm 0.4\%$ で

あり、胆汁クリアランス(CL_{bile}) は、 1.62 ± 0.88 mL/min/kg および 0.45 ± 0.23 mL/min/kg であり、*R*-CLN の方が約 4 倍有意に大きかった。投与量に対する胆汁中未変化体排泄率は 5% 前後と全体に占める割合が小さいが、排泄過程において最も光学特異性を示したのは胆汁排泄であった。

吸収における光学異性体の差を明らかにするために、(*rac*)-CLN 十二指腸内投与後の各異性体の血漿中濃度推移を検討したところ、*R*- および *S*-CLN のバイオアベイラビリティ (F) は 92% および 102% であり、有意な差は見られなかった。さらに、*in situ* 吸収実験として腸管ループからの吸収率を求めたところ、*R*- および *S*-CLN の吸収率は、投与後 10 分では 31.7% および 32.0% であり、30 分では 72.9% および 73.3% であった。吸収過程において光学特異性は見られなかった。

血漿中タンパク非結合形分率を *in vitro* での限外濾過法により求めた結果、*R*- および *S*-CLN の血漿タンパク非結合形分率は、それぞれ $48.8 \pm 3.1\%$ および $33.1 \pm 1.5\%$ であり、異性体間で有意な差が認められた。この結果より、 Vd_{ss} が *R*-CLN のほうが大きくなった一因として、血漿中タンパク非結合形分率の差によるものと考えられた。しかし、 Vd_{ss} の差すべてを説明するには十分でないと考えられる。得られた CLN の胆汁排泄や、十二指腸内投与後の急速で完全な吸収、また他の β 作動薬の報告から、腸肝循環の存在が推察され、CLN 光学異性体の腸肝循環における差が、 Vd_{ss} にも影響を及ぼしていると考えられた。

Table 1. Pharmacokinetic parameters of CLN enantiomers after i.v. administration of 2 mg/kg (*rac*)-CLN to rats

	<i>R</i> -CLN	<i>S</i> -CLN
AUC _{0→∞} (μg·hr/mL)	1.25 ± 0.18	1.51 ± 0.35
MRT (hr)	11.2 ± 2.0	6.0 ± 0.7 *
t _{1/2} (hr)	19.1 ± 5.5	14.1 ± 5.1 *
CL _{tot} (mL/min/kg)	13.5 ± 1.8	11.5 ± 2.7 *
Vd _{ss} (L/kg)	9.17 ± 2.76	4.14 ± 1.00 *

Moment analysis of CLN from plasma concentration after i.v. administration of (*rac*)-CLN (2 mg/kg) to rats (298 ± 27 g, n = 4). * Significant difference between *R*-CLN and *S*-CLN at $p < 0.05$; Student's *t* test.

血漿中濃度-時間推移から血液と組織での十分な平衡状態にあると考えられる、*(rac)*-CLN 静脈内投与後 36 時間の肝臓、腎臓、肺および筋肉の組織内濃度を測定し、血漿中濃度に対する組織中濃度の比 (K_p 値) および $K_{p,f}$ 値を算出した (Table 2)。肝臓と腎臓における *S*-CLN の濃度は高く、 $K_{p,f}$ 値はいずれの組織においても *S*-CLN のほうが有意に大きかった。36

時間で算出された K_p 値の差異は、*S*-CLN が組織への不可逆的結合することによる可能性が推測される。これは *S*-CLN の副作用発現に影響を及ぼすかもしれない。

これまでの結果より、*S*-CLN のほうが CL_{tot} が小さく、繰り返し投与後の定常状態における血漿中濃度は *S*-CLN のほうが高いと予測される。さらに、 $K_{p,f}$ 値も *S*-CLN のほうが大きいことから、血漿中濃度以上に組織内濃度も *S*-CLN が高くなり、その作用(副作用)が大きく現れる可能性がある。

上記の結果は、医薬品としての光学異性的に純粋な *R*-CLN の開発が望ましいことを示唆する。さらに、CLN の異性体の変換は *in vitro*、*in vivo* で起こらないことが示され、医薬品として光学異性的に純粋な *R*-CLN を開発することが可能である。ラセミ体としての CLN 製剤と比較し、*R*-CLN の単独製剤は、より安全性の高い製剤として有用であると考えられる。

Table 2. Tissue-to-plasma concentration ratio (K_p) of *R*-CLN and *S*-CLN at 36 hours after intravenous administration of *(rac)*-CLN.

		<i>R</i> -CLN	<i>S</i> -CLN
Liver	Concentration (ng/g)	17.72 ± 5.19	22.85 ± 4.80 *
	K_p	5.28 ± 2.19	24.85 ± 5.82 *
	$K_{p,f}$	10.03 ± 4.16	73.10 ± 17.11 *
Lung	Concentration (ng/g)	10.21 ± 8.12	9.84 ± 7.48
	K_p	2.63 ± 1.04	9.75 ± 4.69 *
	$K_{p,f}$	5.01 ± 1.97	28.68 ± 13.79 *
Kidney	Concentration (ng/g)	6.90 ± 2.19	10.77 ± 1.91 *
	K_p	1.99 ± 0.65	11.84 ± 3.02 *
	$K_{p,f}$	3.79 ± 1.24	34.82 ± 8.87 *
Mussule	Concentration (ng/g)	1.85 ± 0.31	1.71 ± 0.28
	K_p	0.58 ± 0.28	1.91 ± 0.60 *
	$K_{p,f}$	1.10 ± 0.54	5.61 ± 1.75 *
Plasma	Concentration (ng/mL)	3.92 ± 2.22	0.95 ± 0.28 *

(rac)-CLN (2 mg/kg) was administered intravenously to rats. At 36 hours after administration, rats were decapitated and the plasma and tissues were isolated and weighed. Each value represents the mean ± S.D. (n = 5).

* Significantly different between *R*-CLN and *S*-CLN at $p < 0.05$; Student's *t* test.

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

Clenbuterol のラットにおける体内動態の光学特異性

2. 論文提出者 (1) 所属 生命科学 専攻 分子作用学 講座

(2) 氏名 廣澤 伊織

3. 審査結果の要旨（600～650字）

Clenbuterol (CLN) は、ラセミ体として市販されているが、その β_2 受容体刺激作用は *R* 体によるもので、*S* 体にはそのような作用はほとんどなく、血圧低下やグルココルチコイドの上昇、血糖値の増加などの副次的な作用を持つ。しかしながら、CLN のラセミ体を医薬品として投与した際の光学異性体の体内動態についての報告はないため、各異性体の高感度分析法の開発から始めて、詳細な体内動態検討を行った結果、以下のような成果を得た。

- 1) まず、キラルカラム(CHIROBIOTIC™ T) を用い、質量分析器 (MS/MS) により、*R*- および *S*-CLN を定量下限 0.25 ng/mL で測定可能で、ラットなどの小動物での動態解析に十分な分離、分析可能な方法を確立した。
- 2) この方法を用いて、CLN 光学異性体は、リン酸緩衝液 (pH 7.4) およびラット血漿中、更には生体内においても互変異性化しないことを確認した。
- 3) (*rac*)-CLN 2 mg/kg を静脈内投与後の血漿中濃度推移から各異性体の動態学的パラメータを算出したところ、*R*-体の全身クリアランスは *S*-体よりも大きく、分布容積も有意に大きかった。特に、胆汁クリアランスの違いが大きかった。
- 4) *In situ* 腸管吸収実験では、吸収過程における立体特異性は見られなかった。
- 5) *R*-体は、*S*-体に比べて血漿タンパク非結合形分率が有意に大きかった。このことがこれら光学異性体の体内動態の違いの原因であることが示唆された。
- 6) (*rac*)-CLN 静脈内投与後 36 時間の血漿中濃度に対する組織中濃度の比 (K_p 値) から、いずれの組織においても *S*-CLN のほうが組織への結合が強い可能性が示された。

以上より、(*rac*)-CLN を生体に投与した場合、*S*-CLN の作用、即ち、副作用が強く表れる可能性がある。従って、CLN は、医薬品として光学異性的に純粋な *R*-体 としての開発が望ましいことを示唆しており、今後の医薬品開発に重要な知見をもたらすものとして、博士(薬学)論文に値すると判定された。

4. 審査結果 (1) 判定 (いずれかに○印) 合格 ・ 不合格

(2) 授与学位 博士(薬学)