

氏名（本籍） 澤村良子（東京都）  
学位の種類 博士（薬学）  
学位記番号 乙第345号  
学位授与の日付 平成27年11月30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 ロキソニンゲルの体内動態および活性代謝物生成に関する研究

論文審査委員 (主査) 教授 廣田 孝司  
教授 青山 隆夫 教授 花輪 剛久  
教授 牧野 公子 教授 山下 親正

## 論文内容の要旨

ロキソニン（LX）は活性代謝物である *trans*-OH 体が鎮痛・抗炎症作用を示す、プロドラッグである。1986年に経口剤として本邦で上市され、急性あるいは慢性炎症及び疼痛、発熱を伴う各種疾患の治療に汎用されている。しかし、経口投与後の血漿中半減期は約1時間と短く、1日3回投与が必要である。また、他の経口非ステロイド性抗炎症薬に比べて頻度は低いものの、薬理作用の延長上にある副作用として消化管障害や腎障害が認められる場合もある。そのため、全身曝露を低く抑えながら、炎症局所に有効な薬物濃度が長時間維持できると考えられる経皮吸収製剤・ロキソニンゲル（LX-G）が開発された。本研究は、ラットを用いた LX-G の体内動態的特長の証明、並びにヒト皮膚における活性代謝物生成とその機構の解明を目的に実施した。

最初に、ラットにおける LX-G の体内動態を評価した。LX-G 塗布部の皮膚において、非塗布部よりも高濃度に *trans*-OH 体が存在したことから、ラット皮膚において *trans*-OH 体が生成することが見出された。更には、塗布部直下の骨格筋中 *trans*-OH 体濃度が非塗布部よりも高かったことより（ $C_{max}$  比: 16 倍）、皮膚で生成した *trans*-OH 体が薬効ターゲットである骨格筋へ直接的に移行することが考えられた。次に、ラットに LX-G を経皮投与後と LX を経口投与後の薬物動態の差異を評価した。いずれも投与量 7.5 mg/kg において、経皮投与後の骨格筋中 *trans*-OH 体濃度の  $C_{max}$  は経口投与時の約 1/3 であったが、薬効濃度は長く持続したことから（経皮: 24 時間、経口: 8 時間前後）、経皮投与は経口投与よりも

薬効が持続することが推測された。また、放射性標識 LX ( $^{14}\text{C}$ -LX) を用いた分布試験において、経皮投与後の循環血および臓器における  $^{14}\text{C}$ -LX 由来の放射活性濃度は経口投与時よりも低かったことより（循環血および臓器における経口投与時の  $\text{AUC}_{0-168\text{h}}$  に対する経皮投与時の  $\text{AUC}_{0-168\text{h}}$  比: 1.3-16.8%）、経口投与によって稀に生じる全身性の副作用は、経皮投与では更に生じ難い可能性が示唆された。加えて、経皮投与後の血漿、塗布部皮膚および尿中代謝物プロファイルは経口投与と同じであり、未知代謝物による毒性は生じ難いと考えられた。更には、経皮投与後の排泄経路は経口投与時と同じ尿排泄であったことから、LX-G を経皮投与後の皮膚および骨格筋中の LX および *trans*-OH 体は血中へ移行した後、経口投与と同様に代謝され、かつ同じ経路で排泄されると考えられた。

ヒトにおいて LX-G が局所的に薬効を示すためには、LX-G の塗布部において *trans*-OH 体が生成する必要がある。また、経皮投与では、皮膚に薬物が高濃度に曝露されることから、ヒト皮膚において大量の未知代謝物が生成する可能性が懸念される。そこで、 $^{14}\text{C}$ -LX を使用し、ヒト *in vitro* 皮膚における LX の代謝プロファイルを評価した。その結果、ヒト皮膚において、LX の活性代謝物である *trans*-OH 体が生成することが見出された。また、ヒト *in vitro* 皮膚の代謝物プロファイルは、ラットの場合と同様に、LX をヒトに経口投与後の血漿中代謝物プロファイルと同等であり、未知代謝物は検出されなかった。次に、ヒト *in vitro* 皮膚に LX-G を塗布後の LX および *trans*-OH 体の皮内動態を評価した。LX は経時的かつ LX-G 添加濃度依存的にヒト *in vitro* 皮膚を透過し、皮膚直下にある培地へ移行することが示された。また、*trans*-OH 体はヒト *in vitro* 皮膚にて生成後、経時的かつ LX-G 添加濃度に対して飽和性をもって皮膚を透過し、培地へ移行することが示された。更に、LX の皮膚透過性と代謝のキネティクスを定量的に評価するために、皮膚透過と代謝に関する数式モデルを構築し、LX の皮膚透過並びに代謝データを解析した。その結果、*trans*-OH 体の皮膚透過速度定数は LX よりも約 6 倍大きかった。また、*trans*-OH 体生成における LX の  $K_m$  値は 10.3 mM と算出された。更に、*trans*-OH 体は 4 種の立体異性体から構成されると考えられ、(2*S*, 1'*R*, 2'*S*)-*trans*-OH 体が強い薬理活性を示すことから、ヒト *in vitro* 皮膚に LX を塗布後の *trans*-OH 体の立体異性体生成を評価した。その結果、ヒト *in vitro* 皮膚において活性本体である (2*S*, 1'*R*, 2'*S*)-*trans*-OH 体が生成することを確認した。

LX はヒト皮膚において *trans*-OH 体に代謝されることが示されたが、*trans*-OH 体生成酵素の性質は *trans*-OH 体の薬物動態、ひいては薬効の極めて重要な決定因子となりうる。そこで、ヒト皮膚における *trans*-OH 体生成の詳細を把握するために、ヒト皮膚における *trans*-OH 体生成酵素の同定および特性評価を行った。まず、既にヒト肝臓における LX の代謝に carbonyl reductase (CBR) が寄与していることが報告されていたため、ヒト CBR の isoform の発現系を用いて *trans*-OH 体の生成を評価した。その結果、CBR1 の代謝活性が高く、CBR3、CBR4 の代謝活性は低かった。次に、ヒト皮膚における *trans*-OH 体生成

に対する CBR1 の寄与を調べるために、抗 CBR1 抗体を用いてヒト皮膚中 CBR1 を取り除いた場合の *trans*-OH 体生成を評価した。その結果、抗 CBR1 抗体によって、ヒト皮膚における *trans*-OH 体生成は 80%以上抑制された。また、ヒト CBR1 による *trans*-OH 体生成を定量的に評価するために、ヒト CBR1 タンパクを用いた代謝キネティクス試験を行った。その結果、 $K_m$  と  $V_{max}$  は 7.30 mM および 402 nmol/min/mg protein であり、ヒト皮膚を用いた透過/代謝試験における  $K_m$  (10.3 mM) とほぼ同等の  $K_m$  であった。これらの結果より、CBR1 がヒト皮膚における *trans*-OH 体生成の主代謝酵素であることが示された。

本研究の結論を以下にまとめる。ラットにおいて、経皮投与時は経口投与に比べて全身曝露が低く、治療ターゲット部位においては一定濃度が持続していることが明らかとなった。また、経皮投与特異的な未知代謝物が生じないことが確認された。次に、ヒト *in vitro* 皮膚において活性代謝物である *trans*-OH 体、更には、活性本体である (2*S*, 1'*R*, 2'*S*)-*trans*-OH 体が生成することが示された。ラットと同様に、ヒト皮膚においても経皮投与特異的な未知代謝物は生じないことが確認された。加えて、ヒト皮膚において、LX は CBR1 によって還元代謝を受け、活性代謝物である *trans*-OH 体が生成することが判明した。以上より、本研究は、非臨床における LX-G の体内動態的特長の証明ならびにヒト皮膚における活性代謝物の生成とその機構の解明に寄与し、LX-G の製品化に貢献した。

## 論文審査の結果の要旨

ロキソニン (LX) は活性代謝物である *trans*-OH 体に体内で変換後、鎮痛・抗炎症作用を示すプロドラッグである。1986 年に経口剤として本邦で上市され、急性あるいは慢性炎症及び疼痛、発熱を伴う各種疾患の治療に汎用されている。しかし、経口投与後の血漿中半減期は約 1 時間と短く、1 日 3 回の頻回投与が必要である。また、他の経口非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) に比べて頻度は低いものの、薬理作用の延長上にある副作用として消化管障害や腎障害が認められる場合もある。そこで筋肉痛等、局所の鎮痛消炎に対して、上記の問題点を改善するために、全身曝露を低く抑えながら、炎症局所に有効な薬物濃度が維持できると考えられる経皮吸収製剤・ロキソニンゲル (LX-G) が開発された。本論文はその開発コンセプトの妥当性を証明するために、ラットを用いた LX-G の体内動態的特長、ならびにヒト皮膚における活性代謝物生成の機構を明らかにし、その研究成果を、以下の 3 章にまとめたものである。

第 1 章において、ラットにおける LX-G を経皮投与後の吸収、分布、代謝および排泄 (ADME) プロファイルを評価した。さらに、投与経路間の薬物動態の差異あるいは類似点を見出すために、LX を経口投与した場合の ADME プロファイルと比較した。LX-G を経皮投与後の塗布部皮膚において、活性代謝物である *trans*-OH 体が生成し、かつ *trans*-OH

体が薬効ターゲットである骨格筋へ直接移行することを見出した。また、LX-G を経皮投与後の骨格筋において *trans*-OH 体は経口投与時よりも持続的に存在することを明らかにした。さらに、LX-G を経皮投与後の全身曝露（血中濃度）は、LX を経口投与時よりも大幅に低いことを示した。一方、両投与経路間で代謝物プロファイルおよび主排泄経路（腎排泄）は同じであることを確認した。以上の結果より、LX-G を経皮投与時は LX を経口投与時に比べて、持続的に薬効を示し、かつ全身性の副作用のリスクが軽減される可能性を示した。また、経皮投与特異的な未知代謝物による毒性が生じる可能性は低いことも示した。

第 2 章では、ヒト *in vitro* 皮膚における *trans*-OH 体および経皮投与特異的な未知代謝物の生成の有無について評価した。ヒト *in vitro* 皮膚において、活性代謝物である *trans*-OH 体が LX-G の塗布量依存的に生成し、さらに *trans*-OH 体が速やかに皮膚直下の培地へと移行することを明らかにした。ヒト *in vitro* 皮膚を用いた透過・代謝試験データのモデル解析により、*trans*-OH 体の皮膚透過速度定数が LX の皮膚透過速度定数の約 6 倍大きく、ヒト *in vitro* 皮膚における *trans*-OH 体生成の  $K_m$  および  $V_{max}$  は、10.3 mM および 0.0234  $\mu\text{mol/h}$  と算出した。*Trans*-OH 体は 4 種の立体異性体から構成されていると考えられており、そのうち活性本体は(2*S*, 1'*R*, 2'*S*)-*trans*-OH 体のみであることが分かっているが、本研究により、ヒト *in vitro* 皮膚においてその(2*S*, 1'*R*, 2'*S*)-*trans*-OH 体が生成することを見出した。さらに、ラットと同様、経皮投与特異的な未知代謝物は生成しないことも確認した。以上の結果より、ヒト皮膚に LX-G を塗布した場合にも、持続的に薬効が示し、かつ経皮投与特異的な未知代謝物による毒性が生じる可能性は低いことを示した。

第 3 章では、ヒト皮膚における *trans*-OH 体生成酵素の同定を行った。ヒト carbonyl reductase (CBR) 分子種の発現系を用いた代謝試験より、CBR1 が CBR3、CBR4 よりも *trans*-OH 体生成活性が高いことを示した。次に、抗 CBR1 抗体を用いたヒト皮膚中 CBR1 の除去により、CBR1 がヒト皮膚における主な *trans*-OH 体生成酵素であることを見出した。さらにヒト CBR1 発現系を用いた代謝キネティクス試験より、CBR1 発現系における  $K_m$  値は 7.30 mM と算出され、ヒト *in vitro* 皮膚における *trans*-OH 体生成の  $K_m$  値(10.3 mM) とほぼ同等であることを示した。以上の結果より、ヒト皮膚において、LX は CBR1 によって還元代謝を受け、活性代謝物である *trans*-OH 体が生成することを明らかにした。

以上、本論文での研究を通し、経皮吸収製剤・ロキソニンゲル (LX-G) の非臨床における体内動態の特長の証明、ならびにヒト皮膚における活性代謝物の生成とそれに関与する主たる酵素、機構を明らかにし、LX-G 製剤の有用性の根拠を証明し、製品化に貢献した。また、今回得られた薬物動態学に関する重要な知見を今後創薬の現場にフィードバックすることにより、臨床的価値の高い医薬品の創製に寄与できるものと考えられる。

本論文は、医薬品の開発、特に新製剤の戦略的開発を薬物動態的側面から支持する研究の好例として有意義な研究成果であり、著者に博士（薬学）の学位を与えるのに十分な価値を有すると判断する。