



Title	Pyridoxinのbioavailabilityに関する研究
Author(s)	北尾, 和彦
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31629
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	北 尾 和 彦
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	第 3 9 0 1 号
学位授与の日付	昭和 52 年 3 月 25 日
学位授与の要件	薬学研究科 応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	Pyridoxin の bioavailability に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 鎌 田 皎 (副査) 教 授 上原喜八郎 教 授 岩田平太郎 教 授 三浦 喜温

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

生体に経口投与された薬物が薬効を発現するためには、まず消化管から吸収されなければならない。

Bioavailability (生物学的利用率) は、投与された薬剤の主要成分が体内あるいはその作用部位に吸収、あるいは到達する速度および量と定義されている。近年、bioavailability が医薬品の有効性、安全性に関連して注目を集め、特にある薬物を同一剤形で生体に投与してもその治療効果が等しくな

いことがあり、これが bioavailability に関係することが指摘されている。

難吸収性薬物の bioavailability を改善することは、薬効の増強あるいはその投与量の減少が可能となり、さらに安全性の観点から生物薬剤学の重要課題となっている。

Bioavailability を増加させるには、主薬の粒子径や結晶形の変更、添加剤の配合等による製剤的修飾 (Pharmaceutical modification) と薬効の本質を変えないで親油基、親水基の導入あるいは造塩等、化学構造を修飾する化学的修飾 (Chemical modification) による方法がある。このうち後者について、酵素的作用あるいは他の適当な非酵素的作用により、もとの活性な親化合物に還元するような化学的修飾をした薬物の誘導体をプロドラッグ (Pro-drug) といい、吸収性の改善の目的にも多くの pro-drug が臨床的に実用されている。

Pyridoxin は脳代謝・機能改善薬として脳出血後遺症、動脈硬化症、脳炎、髄膜炎後遺症および頭部外傷後遺症等の治療に用いられている。著者はこれを犬に経口および静脈内投与後の血中および尿中排泄動態を検討し、この薬物の生体内挙動を明確にした。さらに、化学修飾により pyridoxin をエステル化した数種の pro-drug を合成し、bioavailability の改善を試みた。

本 論

第1章 犬の血中および尿中代謝物

Pyrithioxin(I), 3,3'-(dithiodimethylene) bis[5-hydroxy-6-methyl-4-pyridinemethanol], はビタミンB₆の誘導体であるが, ビタミンB₆作用および抗ビタミンB₆の作用のいずれをも持っていない。その薬品作用について, 薬理学, 臨床医学領域における報告は数多い。しかし, 吸収, 分布, 代謝および排泄等の生体内挙動に関する報告は少ない。

Iの代謝に関して, Nowakは³⁵S-pyrithioxinをラット, 家兎, モルモットおよび犬に経口投与後, その尿中代謝物を薄層クロマトグラフィー(TLC)で検索した。Dargeらはラットおよび人で³⁵S-pyrithioxinの薬動力学(Pharmacokinetics)および代謝を研究した。彼らはラット, 家兎およびモルモットの尿中に5'-desoxy-5'-methylsulfinylpyridoxol(II)および5'-desoxy-5'-methylthiopyridoxol(III)を認め, 未変化のIは検出されなかったと報告している。また, 犬では予備実験で尿中にIIIのみを認めたが, さらに多くの犬を使用して実験し, IIおよびIIIを認め, さらに親水性が非常に強い2種の未知代謝物を認めている。

著者は犬にpyrithioxin 2塩酸塩(I·2HCl)を経口投与後, 尿中代謝物をTLCおよび高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で検索した。なお, I, IIおよびIIIの構造式をChart 1に示す。

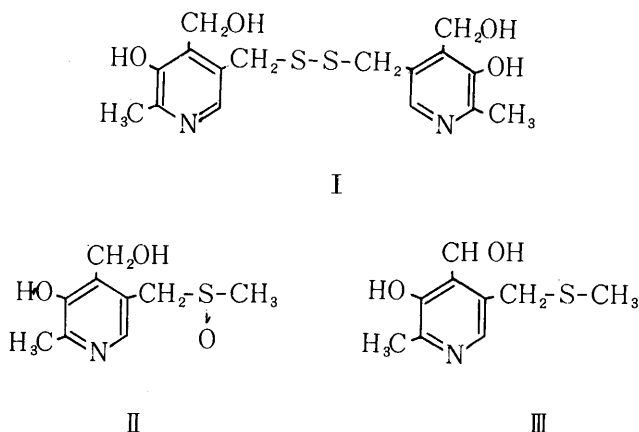


Chart 1

その結果, 血中には5'-desoxy-5'-methylsulfinylpyridoxol(II)が, 尿中にはpyrithioxin-glucuronide(I-G), IIおよびII-glucuronide(II-G)が存在することを明らかにした。また, 未変化のIはいずれの試料でも認められなかった。I·2HClを静脈内投与した場合, 尿中代謝物は経口投与の場合と同様に, I-G, IIおよびII-Gであった。Nowakらが, 犬での主代謝物の一つであると報告している5'-desoxy-5'-methylthiopyridoxol(III)は排泄された尿中で微生物等によりIIが変化したものであることがわかった。

I·2HClを経口投与後の代謝経路をChart 2に示す。



—191—

I・2HClを静注後、IIの血中濃度は10分後に最高血中濃度を示し、その後、血中濃度—時間曲線の片対数プロットは、経口投与時と同様に不規則な減少を示した。この原因がI-Gの腸肝循環によることを明らかにした。

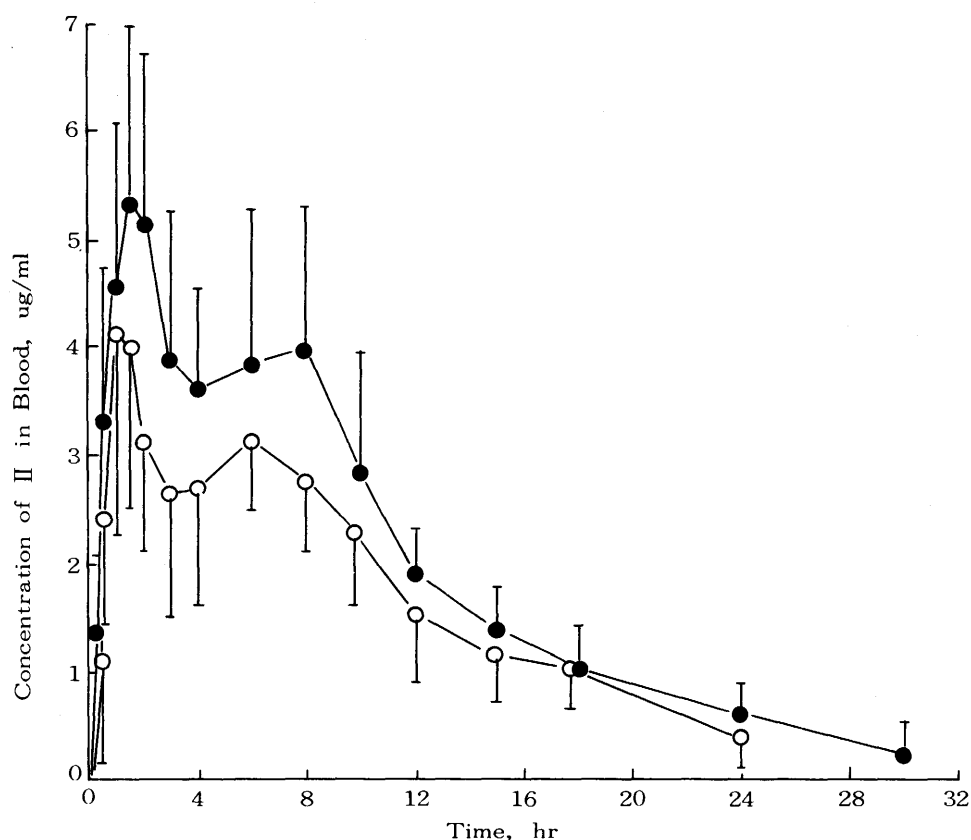


Fig.1. Mean Blood Concentration of II after Single Oral Administration of I·2HCl to Six Dogs.

Key: ○, 59.9mg/kg ; and ●, 119.8mg/kg

Each point represents the mean and bars indicate SD.

I・2HCl 59.9mg/kg を硬カプセル剤として経口投与した場合、各代謝物の投与量に対する尿中排泄パーセントは I-G, II, II-G でそれぞれ 2.6, 19.0, 4.3% となり、その総和は 25.9% であった。この低い availability の原因は、I の腸管内での低い溶解度および胆汁を介し腸管に排泄された II-G の低い再吸収性に起因することを明らかにした。

第4章 Pro-drug による bioavailability の改善

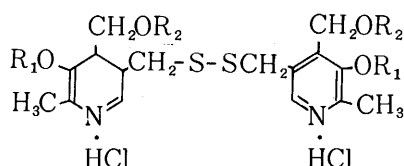
最近、親化合物 (Parent drug) の好ましくない性質を改善するために、化学的修飾によりそれを、pro-drug とすることに興味をもたれている。

著者は、pyrithioxin (I) がその分子中に hydroxyl 基および hydroxymethyl 基を持っていることからこれらをエステル化し、その物理化学的性質を変化させることにより、bioavailability を改善する

ことを試みた。

そこで、4種のI・2HClのエステル誘導体を合成した。その略称、構造式、分子量および融点をTable IIに示す。またそれぞれの誘導体について、薬物投与後8時間までのAUC(AUC₀₋₈)、24時間までのAUC(AUC₀₋₂₄)、最高血中濃度およびその到達時間を求め、4匹の犬での平均値および標準偏差を求めた(Table III)。

Table II. Pyrithioxin Dihydrochloride Derivatives.



Compounds	Symbols	R ₁	R ₂	mol. wt.	mp
Pyrithioxin · 2HCl	I · 2HCl	H	H	441.4	184°
I-tetraacetate · 2HCl	I-A · 2HCl	CH ₃ CO	CH ₃ CO	609.5	159—160°
I-tetrapropionate · 2HCl	I-P · 2HCl	CH ₃ CH ₂ CO	CH ₃ CH ₂ CO	665.6	170—172°
I-tetra-n-butyrate · 2HCl	I-B · 2HCl	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CO	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CO	721.8	162—164°
I-4,4'-disuccinate · 2HCl	I-S · 2HCl	H	HOOCCH ₂ CH ₂ CO	687.6	153—154°

Table III. Mean Area under Curve, Peak Blood Concentration, and Peak Time after Single Oral Administration of I · 2HCl and Its Esters to Four Dogs

Compounds	AUC ^{a)} ₀₋₈ , (μg · hr)/ml	AUC ^{a)} ₀₋₂₄ , (μg · hr)/ml	Peak Blood Conc., μg/ml	Peak Time, hr
I · 2HCl	21.2 ± 2.0 ^{b)}	40.9 ± 6.0	4.45 ± 1.07	1.25 ± 0.29
I-A · 2HCl	26.1 ± 1.6 ^{***c)}	37.4 ± 3.3	5.73 ± 1.19	1.88 ± 0.25 ^{**}
I-P · 2HCl	36.1 ± 3.8 ^{**}	52.3 ± 11.5	7.25 ± 0.53 ^{**}	2.75 ± 0.87 ^{**}
I-B · 2HCl	8.3 ± 2.2 ^{**}	12.9 ± 3.6 ^{**}	1.45 ± 0.24 ^{**}	2.25 ± 0.87 ^{**}
I-S · 2HCl	8.8 ± 3.0 ^{**}	17.3 ± 9.2 ^{**}	1.55 ± 0.67 ^{**}	4.00 ± 2.31 ^{**}

a) AUC was calculated by Trapezoidal Method.

b) Values reported are mean ± SD for dogs.

c) Two asterisk indicates means that are significantly different (p < 0.01) from I · 1HCl. 2HCl.

その結果、pyrithioxin-tetrapropionate 2塩酸塩の経口投与でbioavailabilityの上昇が認められ、I · 2HClに比較し、最高血中濃度は1.63倍、0—8時間の血中濃度—時間曲線下の面積(AUC₀₋₈)は1.7倍、尿中回収率は1.47倍増加しbioavailabilityの増加が認められた。

第5章 Pyrithioxin およびそのエステル誘導体の物理化学的性質

著者は、第4章において、pyrithioxin-tetrapropionate 2塩酸塩(I-P · 2HCl)を経口投与した場合、そのbioavailabilityはpyrithioxin 2塩酸塩(I · 2HCl)に比べて改善されることを述べた。

そこで、これらのエステル誘導体経口投与後の吸収特性の変化と物理化学的性質との関係を知る目的

で, pyriothioxin(I) およびそのエステル誘導体の溶解度, 油水分配率を求めた。

37° における I, I-P の 1/30M リン酸緩衝液での溶解度および n-オクタノール-1/30M リン酸緩衝液間の油水分配率の pH プロファイルを測定した (Fig. 2)。

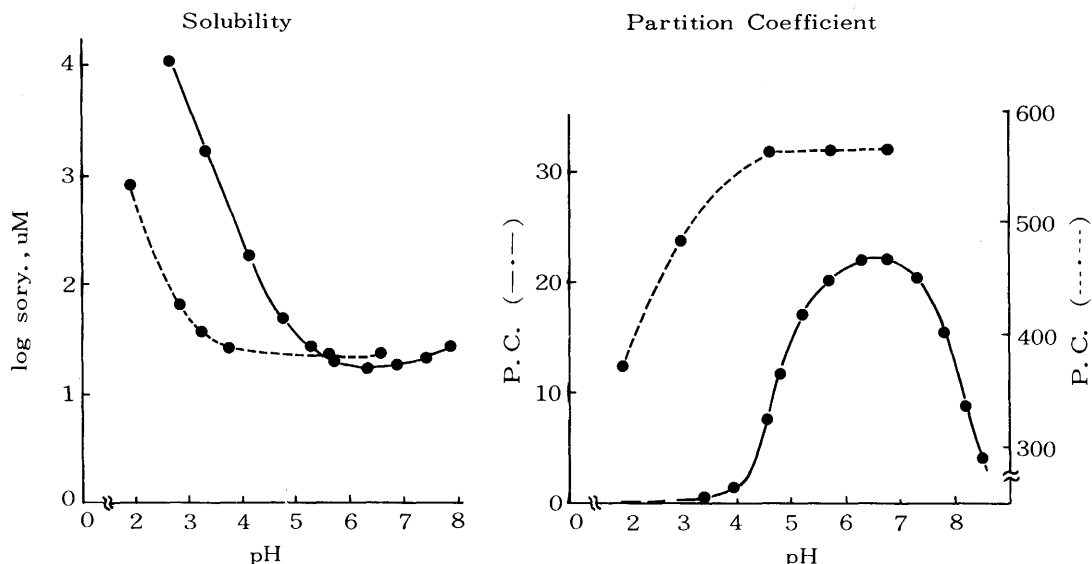


Fig. 2. pH-Profiles of Solubility and Partition Coefficient of I and I-P at 37°.

Key: —●—, I; and ---●---, I-P

その結果, pH 6.5 における I-P の溶解度は予想に反し, I よりやや増加した。また, I-P の n-オクタノールに対する油水分配率は pH 2-7 の範囲で I に比較し, 著しく大きい値を示した。

以上より, I-P · 2HCl を経口投与後の bioavailability の増加は, pH 6.5 でのやや増大した水溶性と pH 2-7 での著しく大きい油水分配率に起因するものと考えられる。また, pyriothioxin-tetra-n-butyrate 2 塩酸塩 (I-B · 2 HCl) および I-S · 2 HCl を経口投与後の吸収率の低下は, I-B の pH 6.5 における低い溶解度 (3.8 μM) と I-S の pH 6.5 での小さい油水分配率 (0.094) に起因するものと考えられる。

第 6 章 Pyriothioxin およびそのエステル誘導体の吸収機構

Wilson のラット反転腸管法を改良した方法を用い pyriothioxin (I) の腸管膜透過について検討した。

その結果, 37° で 1 時間 incubation した後, 漿膜側には I が検出でき代謝物である 5'-desoxy-5'-methylsulfinylpyridoxol (II) および pyriothioxin-glucuronide (I-G) は検出されなかった。この実験はラット小腸を使用したものであり, 犬での *in vitro* の結果を考察するには種差の問題もあり断定はできないが, 少なくとも I は大部分が代謝されずに, 腸管膜を透過するものと考えられる。

また, エステル誘導体は, そのエステルが消化管内あるいは消化管壁で加水分解された後, 消化管膜を透過することを明らかとした。その加水分解は酵素反応であることを認めた。

第 7 章 グリコースの脳内取り込みにおよぼす pyriothioxin エステル誘導体の影響

著者は, I · 2HCl の pro-drug を経口投与した場合, I · 2HCl 投与時と同様な作用がみられるか

どうかを知る目的で、I・2HCl とほぼ同等の bioavailability を示した pyriethoxin-tetraacetate 2 塩酸塩 (I-A・2HCl) および bioavailability の減少した pyriethoxin-4,4'-disuccinate 2 塩酸塩 (I-S・2HCl) を用いて、グルコースのマウス脳内取り込みについて検討した (Table IV)。

Table IV. Incorporation of ^{14}C -Glucose into Mouse Brain after Oral Administration of I・2HCl and Its Esters.

Compounds	Dose, mole/kg	Acid soluble fraction, dpm/mg brain	Acid insoluble fraction, dpm/mg brain
Control	—	1329 \pm 279 ^{a)}	810 \pm 222
I・2HCl	0.653	1527 \pm 184	1112 \pm 235 ^{*b)}
I-S・2HC	0.800	1505 \pm 183	1029 \pm 341
I-A・2HCl	0.505	1601 \pm 156	1030 \pm 89 [*]

a) Values reported are men \pm SD for 6 mice.

b) One asterisk indicates means that are significantly different ($p < 0.05$) from control.

I・2HCl および I-A・2HCl 投与群では、脳の酸不溶性分画の放射活性は、対照群に比較し、有意に増加した ($p < 0.05$)。I-S・2HCl 投与群では、投与量が I・2HCl および I-A・2HCl に比較して多いにもかかわらず、対照群に比較し、有意差は認められなかった。このことより、I-A・2HCl はグルコースの血液-脳関門透過性を増大させる pyriethoxin 活性を有することが明らかとなった。Pyriethoxin-tetrapropionate 2 塩酸塩は、その bioavailability から考えて、I・2HCl と同等かもしくはそれより強い活性を有しているものと考えられる。

結 論

薬物の bioavailability を知ることは、薬効あるいは安全性の観点から重要であり、難吸収性薬物の吸収性の改善は生物薬剤学の重要な研究課題となっている。

著者は、難水溶性薬物である pyriethoxin (I) を用い、それを化学的修飾により pro-drug とし、吸収性の改善を試みた。そこで、まず I の生体内挙動を明確にする目的で、その吸収、分布、代謝および排泄について検討した。

Pyriethoxin 2 塩酸塩 (I・2HCl) をビーグル犬に経口投与後、代謝物を薄層クロマトグラフィー (TLC) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で検索した。

その結果、血中には 5'-desoxy-5'-methylsulfinylpyridoxol (II) が、尿中には pyriethoxin-glucuronid (I-G)、II および II-glucuronide (II-G) が存在することを明らかにした。また、未変化の I はいずれの試料でも認められなかった。I・2HCl を静脈内投与した場合、尿中代謝物は経口投与の場合と同様に、I-G、II および II-G であった。Nowak らが、犬での主代謝物の一つであると報告している 5'-desoxy-5'-methylthiopyridoxol (III) は、排泄された尿中で微生物等により II が変化したものであることがわかった。

血中および尿中におけるこれらの代謝物の分離定量を HPLC を用いて確立した。担体としては、

強酸性陽イオン交換体である Zipax SCX を使用した。移動相としては、I の定量には 2% イソプロパノール含有 0.05M クエン酸リン酸ナトリウム-0.3M 過塩素酸ナトリウム溶液 (pH 5.65), また II および III の定量には 0.05M クエン酸リン酸ナトリウム-0.2M 過塩素酸ナトリウム溶液 (pH 4.00) を用いた。化合物の検出は UV 280nm で行なった。

I・2HCl をビーグル犬に硬カプセル剤で経口投与後、主代謝物である II の血中濃度-時間曲線は投与後約 1.5 時間および 6 時間に 2 つのピークを有することがわかった。I・2HCl を静注後、II は 10 分後に最高血中濃度を示し、その後血中濃度-時間曲線の片対数プロットは、経口投与時と同様に不規則な減少を示した。この原因が I-G の腸肝循環によることを明らかにした。

II・HCl を静注後、II の血中濃度-時間曲線の片対数プロットは biexponential となり、two-compartment opdn model により、その pharmacokinetic parameter を求めた。その結果、II の血中から消失の半減期 ($t_{1/2}$) は約 40 分となり、II の血中からの消失の速いことが明らかとなった。

I・2HCl 59.9mg/kg を硬カプセル剤として経口投与した場合、各代謝物の投与量に対する尿中排泄パーセントは I-G, II, II-G でそれぞれ 2.6, 19.0, 4.3% となり、その総和は 25.9% であった。この低い availability の原因は、I の腸管内での低い溶解度および胆汁を介し腸管に排泄された II-G の低い吸収性に原因することを明らかとした。

つぎに、I・2HCl をエステル化した pro-drug を合成し、bioavailability の改善を試みた。その結果、pyrithioxin-tetrapropionate 2塩酸塩の経口投与で bioavailability の上昇が認められ、I・2HCl に比較し、最高血中濃度は 1.63 倍、0-8 時間の血中濃度-時間曲線下の面積 (AUC_{0-8}) は 1.7 倍、尿中回収率は 1.47 倍増加し bioavailability の増加が認められた。この bioavailability の上昇は、pH 6.5 での溶液度の増加および pH 2-7 で著しく増大した油水分配率が重要な因子となっているものと考えられる。

また、エステル誘導体は、そのエステルが消化管内あるいは消化管内で加水分解された後、消化壁膜を透過することをラット反転腸管法で明らかとした。また、その加水分解は酵素反応であることを認めた。

I・2HCl とほぼ同等な bioavailability を示した pyrithioxin-tetraacetate 2塩酸塩を用い、 ^{14}C -グルコースのマウス脳内取り込みについて検討した結果、I とほぼ同等の pyrithioxin 活性を示すことを明らかとした。

Pro-drug 経口投与後の生理活性と AUC や尿中回収率等の bioavailability との関連性を論ずるには、さらに実験を重ねなければならないが、少なくとも I の化学的修飾による pro-drug はその bioavailability を増加させ、それにより投与量を減少することができ安全性の点で臨床的にも有用であると考えられる。

近年、pro-drug に関する研究が多くなされているが、pro-drug は本来生体内において親化合物に還元することが必須条件であるので、その生体内動態および薬効は親化合物と同様に扱われる。しかし、血中に移行した後親化合物への還元に若干時間を要する pro-drug の場合は、その生体内動態は親化合物と異なることが予想されるので pro-drug および親化合物についての解析が必要である。

Pyrithioxin エステルは消化管吸収の初期段階に加水分解して親化合物に還元するため、その生体内動態および薬効は親化合物と同様に扱うことができた。製剤法の違いにより、経口投与した薬物の体内分布が変化するという報告もあるが、親化合物への還元がおそい pro-drug ではその物理化学的性質が親化合物に比べて著しく異なる場合が多いので、消化管からの吸収のみならず、生体内分布にまで影響をおよぼし薬効そのものも変化することが考えられる。

生物薬剤学で取扱う pro-drug の生体内動態に関する研究に本研究が資することを期待するものである。

論文の審査結果の要旨

Bioavailability (生物学的利用率) は、投与された薬剤の主成分が、体内あるいはその作用部位に到達する速度および量と定義されている。医薬品の有効性・安全性に関連して注目されている。脳代謝・機能改善薬、pyrithioxin (I) は難水溶性医薬品として知られている。本研究はこれをビーグル犬に経口および静脈内投与後の血中および尿中排泄動態を検討する目的で薄層および高速液体クロマトグラフィーについて検討し、(I) およびその代謝物の分別定量法を確立した。

(I) を硬カプセル剤とし、これを経口投与した。吸収されると速かに代謝され 5-desoxy-5'-methyl-sulfinylpyridoxol (II) となり、尿中には (II) のほかに (II)-glucuronide および (I)-glucuronide が認められた。(I) の化学的修飾により bioavailability が改善されることがわかった。

本研究は、生物薬剤学領域で価値ある研究である。