

Title	微生物の医薬品代謝試験への応用：リドカインのヒト代謝を再現する
Author(s)	
Citation	令和5（2023）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2024
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/95178">https://hdl.handle.net/11094/95178</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 令和5年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	ほり しょう 堀 翔	学部 学科	薬学部薬学 科	学年	2年
ふりがな 共同 研究者氏名	たけだ かなこ 武田 佳菜子	学部 学科	薬学部薬学 科	学年	2年
	たにぐち ひかり 谷口 ひかり		薬学部薬学 科		2年
	やました りゆうせい 山下 龍生		薬学部薬学 科		2年
	よしむら そうた 吉村 奏汰		薬学部薬学 科		2年
アドバイザー教員 氏名	はらだ かずお 原田 和生	所属	薬学研究科		
研究課題名	微生物の医薬品代謝試験への応用～リドカインのヒト代謝を再現する～				
研究成果の概要	研究目的, 研究計画, 研究方法, 研究経過, 研究成果等について記述すること. 必要に応じて用紙を追加してもよい. (先行する研究を引用する場合は, 「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い, 盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること.)				
<p>要旨</p> <p>麻酔薬の lidocaine (2-(diethylamino)-N-(2,6-dimethylphenyl)acetamide) は生体内では肝臓に存在する薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) によって monoethylglycinexylidide (N-(2,6-dimethylphenyl)-2-(ethylamino)acetamide, MEGX) などに代謝され排泄されることが知られている<sup>1-3)</sup>. しかし, 昨年度の自主研究において, lidocaine を HLM により処理したところ, 前述の化合物とは異なる質量の代謝物が生成していることが確認された. この未知代謝物の構造を明らかにすることを目指し, 同一代謝物を生成する食品由来微生物をスクリーニングしたところ, 枯草菌がその能力を有することを確認した. 本研究では, 昨年度達成できなかった未知代謝物の構造決定を目的とした. 枯草菌標準株をリドカイン含有培地で大量培養し, 酢酸エチル抽出, オープンカラム, HPLC精製を行い, 0.8 mg の精製画分を得た. 当該画分を高分解能質量分析, NMR に供した結果, 未知代謝物は(Z)-N-(3-ethyl-2-methyloxazolidin-5-ylidene)-2,6-dimethylaniline であることが判明した. 本研究のように, ヒトの医薬品代謝を再現できる食品由来微生物を探索することは, HLM やヒトの血中から検出される未知医薬品代謝物の構造決定や毒性試験を目的とした大量生産に応用でき, 医薬品開発における有用なツールとなることが期待される.</p> <p>1. 背景・目的</p> <p>創薬研究開発では初期に高い薬効が期待されていた化合物が, 臨床試験・治療時に予期せぬ副反応や毒性発現の判明により開発中止となることがある. 臨床試験での開発中止に占める薬物代謝・動態に起因する事例は, 1991年, 2000年, 2011年で, 40%, 9%, 1%と激減している. しかし, 副作用・毒性発現に起因するケースは, 13%, 20%, 19%と高水準のままである<sup>1-3)</sup>. なかでも薬物性肝障害の発症による中止事例が多く, それには薬物代謝酵素による代謝物が関わっていると考えられている<sup>4-7)</sup>. そのため, 開発初期から候補化合物の代謝, 毒性を高精度に評価可能な試験系の確立が求められている. 開発初期の代謝試験では</p>					

ヒト肝臓ミクロソーム (human liver microsome, HLM) が汎用される。しかし、代謝物の構造解析や代謝物の毒性評価に必要な mg 単位の代謝物を調製するために HLM を大量使用することは倫理的に問題がある。ここで、HLM 代謝を再現する大量培養可能な微生物を探索し、評価したい代謝物を大量生産すれば、開発初期に高精度な毒性試験が実施可能となり、治療時の予期せぬドロップアウトを防ぎ、創薬研究開発における成功率向上、費用削減が期待できる。

lidocaine は HLM で主に 3-hydroxylicocaine (A), 4-hydroxylicocaine (B), monoethylglycinexylicocaine (MEGX) (C), 2-(diethylamino)-*N*-[2-(hydroxymethyl)-6-methylphenyl]acetamide (D), 3-hydroxy MEGX (E), 4-hydroxy MEGX (F), glycinexylicocaine (G), 2,6-dimethylaniline (2,6-xylicocaine, DMA) (H), *N*-hydroxylysine, hydroxy DMA に代謝されることが知られている<sup>8-10)</sup> (Fig. 1)。しかし、我々は昨年度の自主研究で lidocaine を HLM により処理した際、上記とは異なる未知代謝物 X を発見した。さらに lidocaine を様々な食品由来微生物により処理したところ、納豆に含まれる枯草菌が代謝物 X を産生することを見出した。そこで、本年度は、lidocaine 添加枯草菌培養液から代謝物 X を精製し、精密質量、核磁気共鳴 (NMR) スペクトルの情報を取得し、構造を決定することを目的とした。

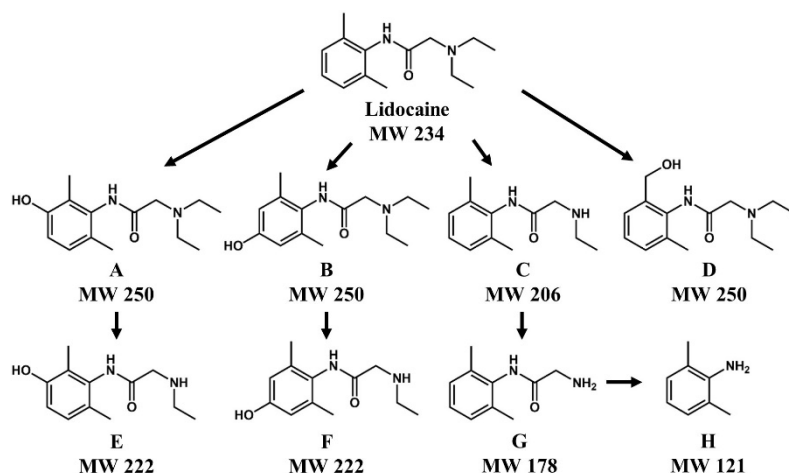


Fig. 1. Known metabolic pathway of lidocaine in human

## 2. 実験方法

### 2-1. 材料

lidocaine を含め本研究で用いた試薬は、特に記載が無い限り富士フィルム和光純薬 (大阪, 日本) を用いた。lidocaine は ethanol で 100 mg/mL の溶液を調製後、適宜希釈して使用した。液体クロマトグラフィー/質量分析 (liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS) に使用した超純水, acetonitrile は LC/MS グレードのものを使用した。LC/MS の測定条件は以下の通りである。LC は Acquity UPLC, MS は Quattro Premier XE (いずれも Waters, Millford, MA, U.S.A) を用いた。カラムは内径 2.1 mm, 長さ 50 mm, 粒子径 1.7  $\mu\text{m}$  の Acquity UPLC BEH C18 (Waters) を用い、40°C に保温した。溶離液は A 液に 0.1% formic acid in distilled water, B 液に acetonitrile を使用し、B 液の組成を 0% (0 min) - 100% (1.5 min) のように変えた。流速は 0.5 mL/min とした。試料導入量は 5  $\mu\text{L}$  とした。イオン化は electrospray ionization (ESI) で行い、極性は正イオンモードとした。キャピラリー電圧は 4.5 kV, コーン電圧は 35 V とした。代謝物の探索は MS scan モードで、代謝物の構造解析 (MS/MS) は product ion scan モードで行った。共にスキャン範囲は  $m/z$  50 - 500 とし、スキャン時間は 0.95 sec, インターバルを 0.05 sec とした。MS/MS 時の collision energy は 25 eV とした。装置制御, データ取得は MassLynx Ver 4.1 を使用した。

## 2-2. 枯草菌の lidocaine 代謝物の精製

LB 培地で独立行政法人製品評価技術基盤機構生物資源センター (NBRC, 東京) から購入した枯草菌の標準菌株である *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* (NBRC3134) を一晩前培養した後, 0.5 g/L の lidocaine を含む LB 培地 4 L で 7 日間振とう培養した. 培養液を酢酸エチルで抽出し, YMC-GEL ODS-A 120-230/70 (株式会社ワイエムシー, 京都) を充填した ODS オープンカラムを用い, 溶離液として 15% アセトニトリルを用いて精製した. 最後に逆相 HPLC で目的代謝物の精製を行った. カラムには Acquity UPLC BEH C18 (2.1 mm i.d. × 50 mm, 1.7 μm, Waters) を用いた. モニタリングには 254 nm の UV 吸光度を用いた.

## 2-3. 精製した lidocaine 代謝物の構造決定

精製画分を重水素クロロホルムに溶解し, NMR で測定した.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz) および  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz) スペクトルは Varian-INOVA600 で測定した. 化学シフトは重水素クロロホルムを基準として, 百万分の一単位で報告した.

## 3. 結果

### 3-1. 枯草菌の lidocaine 代謝物の精製

0.5 g/L の lidocaine を添加した LB 培地を 4 L 調製し, 枯草菌標準株を 7 日間培養した. 培養液を酢酸エチルで抽出し, ODS オープンカラムを用いて精製した. その後, 精製物を逆相 HPLC でさらに精製した. 培養液, 酢酸エチル抽出液, ODS オープンカラムクロマトグラフィーおよび HPLC 精製後の精製画分の LC/MS 結果を Fig. 2 に示した. 最終的に, 逆相 HPLC で精製画分を 0.8 mg を得た.

この HPLC 画分を高分解能質量分析に供した. これまでの LC/MS 分析と同様に,  $m/z$  148 にピークが検出され, その精密質量は  $m/z$  148.1133 であった (Fig. 3 (a)). また, 推定分子式は  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}$  であった (計算質量: 148.1126, 差: 4.7 ppm). さらに, この画分では  $m/z$  233.1660 のピークも検出された (Fig. 3 (b)). 推定分子式は  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}$  (計算質量: 233.1654, 差: 2.6 ppm) であった.  $m/z$  233.1660 の MS/MS 分析では,  $m/z$  148.1133 のプロダクトイオンが検出され (Fig. 3 (b)),  $m/z$  148 のピークが  $m/z$  233.1660 のイオンのフラグメントであることが示された.

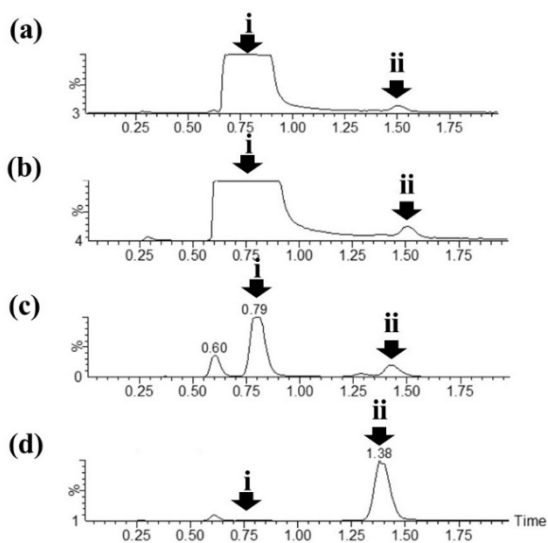
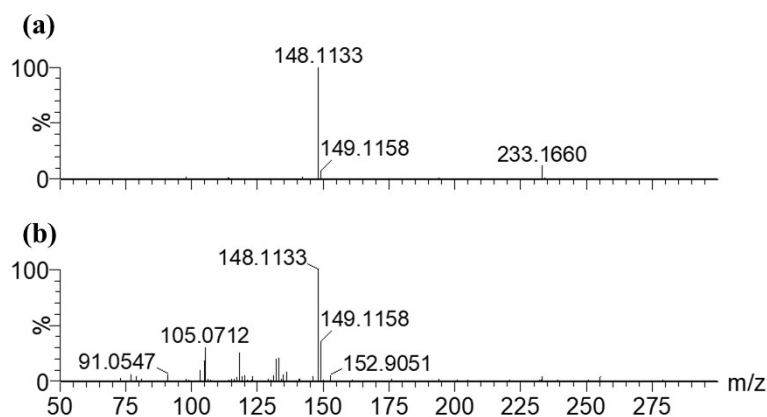


Fig. 2. LC/MS total ion current chromatograms of each purification step

(a) culture medium of *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* No. 3134 supplemented with lidocaine, (b) ethyl acetate extract, (c) combined fractions after ODS open column, (d) after HPLC purification.

Peak i: lidocaine, ii: target metabolite showing  $m/z$  148 and 233.

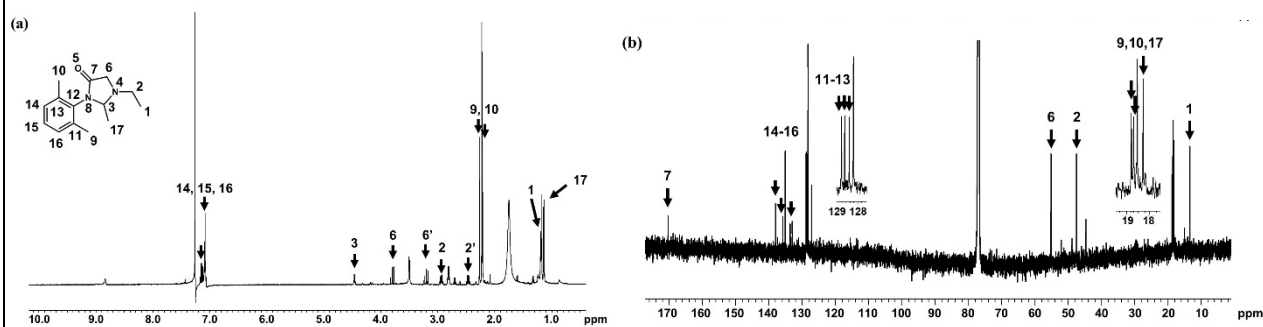


**Fig. 3. High resolution mass spectrometry of HPLC purification fraction**

**(a) Full scan mass spectrum, (b) Product ion scan of  $m/z$  233.1660.**

### 3-2. 精製した lidocaine 代謝物の構造決定

最終的に得られた精製画分を  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz)および  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz)で測定した. いくつかの化合物が混入していたが, 明確なピークが検出された (Fig. 4).  $^1\text{H}$  NMR で検出されたピークは  $\delta = 7.15, 7.09, 4.46, 3.79, 3.19, 2.94, 2.46, 2.27, 2.21, 1.19, 1.14$  ppm であった (Fig. 7 (a)).  $^{13}\text{C}$  NMR で検出されたピークは  $\delta = 170.4, 138.1, 135.8, 133.1, 128.9, 128.8, 128.4, 55.2, 47.6, 18.8, 18.7, 18.3, 13.4$  ppm であった (Fig. 7 (b)). これらの結果と精密質量  $m/z$  233.1660 から, 未知代謝物は (Z)-N-(3-ethyl-2-methyloxazolidin-5-ylidene)-2,6-dimethylaniline であると判明した.



**Fig. 4.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the HPLC fraction containing the lidocaine metabolite showing at  $m/z$  148 and 233.**

## 4. 考察

酢酸エチル, ODS オープンカラム, および逆相 HPLC による精製によって, 0.8 mg の精製画分が得られた. 高分解能質量分析により,  $m/z$  148.1133 および 233.1660 が検出された. また,  $m/z$  233.1660 の MS/MS 分析では,  $m/z$  148.1133 のプロダクトイオンが検出された (図 6 (b)). これは未知代謝産物の分子関連イオンが  $m/z$  233.1660, そのフラグメントイオンが  $m/z$  148.1133 であることを示している. また,  $m/z$  233.1660 の推定分子式は  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}$  である. この推定分子式と未知代謝物を含む精製画分の NMR の測定結果より, 未知代謝物は (Z)-N-(3-ethyl-2-methyloxazolidin-5-ylidene)-2,6-dimethylaniline であると考えられる. 本化合物は Ren らによって, *Bacillus megaterium* の P450BM3 (CYP102A1) によって

lidocaine 代謝中に代謝物として生成されていることが報告されている<sup>11)</sup>。また、サルでも lidocaine 代謝物として報告されている<sup>12)</sup>。しかし、HLM で本化合物が報告されている文献はなかった。

私たちは枯草菌を用いて、(Z)-N-(3-ethyl-2-methyloxazolidin-5-ylidene)-2,6-dimethylaniline が HLM の lidocaine 代謝物であることを初めて発見した。lidocaine の作用機序は近年になって、詳細に解明され始めた<sup>13-16)</sup>。よって、本化合物が HLM における lidocaine 代謝物であることの発見は、lidocaine に関する新たな知見として作用機序の解明に貢献することが期待される。また本研究により、コストや倫理的な問題から詳細な研究が行われていなかったヒトにおける医薬品代謝物を、これまでよりも低コストかつ倫理的な問題もなく研究できる可能性も見出された。

本研究は lidocaine に関する将来的な研究、微生物を使用した薬物代謝産物の同定、および HLM の CYP に関する研究に新たな知見を提供する可能性がある。

## 5. 結論

昨年度の研究も含め、本研究では、まず、lidocaine を HLM により処理したところ未知の代謝物が存在することを確認した。しかし、その代謝物に対してこれまでヒトでの検出の報告は無く、市販されている試薬も無かったため、NMR による構造解析が必要であった。そこで、食品微生物から枯草菌を選定し、枯草菌標準株を用いて大量培養することにより、NMR による構造解析に必要な量を調製した。そして、NMR によって(Z)-N-(3-ethyl-2-methyloxazolidin-5-ylidene)-2,6-dimethylaniline だと同定され、HLM における未知の lidocaine 代謝物の構造を決定した。このように、ヒトの医薬品代謝を再現できる食品由来微生物を探索することは、HLM やヒトの血中から検出される未知の医薬品代謝物を構造決定や毒性試験の目的で大量生産することに応用でき、医薬品開発において有用なアプローチと言える。

これらの成果は、Biological and Pharmaceutical Bulletin 誌に原著論文として投稿する予定である。

## 6. 参考文献

- 1) Arrowsmith J. Phase II Failures. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 328-329 (2011).
- 2) Arrowsmith J. Phase III and submission failures: 2007–2010. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 87 (2011).
- 3) Arrowsmith J. Phase II and Phase III attrition rates 2011–2012. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **12**, 569 (2013).
- 4) Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N. Eng. J. Med.*, **349**, 474-485 (2003).
- 5) Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov.*, **4**, 489-499 (2005).
- 6) Kaplowitz N. Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug Saf.*, **24**, 483-490 (2001).
- 7) Masubuchi Y, Umeda S, Chiba M, Fujita S, Suzuki T. Selective 3-hydroxylation deficiency of lidocaine and its metabolite in Dark Agouti rats. *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 693-695 (1991).
- 8) Yasuhiro Masubuchi. *et. al.* Selective 3-hydroxylation deficiency of lidocaine and its metabolite in Dark Agouti rats. *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 693-695 (1991).
- 9) Jian-Dong Duan. *et. al.* Assessment of the Medicines Lidocaine, Prilocaine, and Their Metabolites, 2,6-DMA and 2-Methylaniline, for DNA Adduct Formation in Rat Tissues. *Drug Metab. Dispos.*, **8**, 1470-1475 (2008).
- 10) Gregory S Doran. *et. al.* Direct detection of glucuronide metabolites of lidocaine in sheep urine. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1076**, 84-90 (2018).
- 11) Ren X, Yorke JA, Taylor E, Zhang T, Zhou W, Wong LL. Drug oxidation by cytochrome P450BM3: metabolite synthesis and discovering new P450 reaction types. *Chem. Eur. J.*, **21**, 15039-15047 (2015).
- 12) Breck GD, Trager WF. Oxidative N-dealkylation: A mannich intermediate in the formation of a new metabolite of lidocaine in man. *Science*, **173**, 544-546 (1971).
- 13) Lenkey N, Karoly R, Epresi N, et al. Binding of sodium channel inhibitors to hyperpolarized and depolarized conformations of the channel. *Neuropharmacology*, **60**, 191–200 (2011).
- 14) Scholz A. Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. *Br J Anaesth.*

**89**, 52–61 (2002).

- 15) Gawali VS, Lukacs P, Cervenka R, et al. Mechanism of modification, by lidocaine, of fast and slow recovery from inactivation of voltage-gated Na (+) channels. *Mol Pharmacol*, **88**, 866–79 (2015).
- 16) Komai H, McDowell TS. Local anesthetic inhibition of voltage-activated potassium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Anesthesiology*, **94**, 1089–95 (2001).