プロドラッグによる azidothymidine の脳移行性改善

木村聡城郎・小野川雅英・柳本恵理・黒崎勇二・

中山太二^{*1)}、溝渕憲子・小西良士^{*2)}、北川幸己^{*3)}

Brain-targeted prodrugs of azidothymidine

Five azidothymidine(AZT) prodrugs conjugated with the 1-adamantane moiety or the acyl group via an ester bond were evaluated as the brain-directed prodrug in rats. All the prodrugs showed the high lipophilicity and four of them were rapidly degraded to AZT in both plasma and brain homogenates. Adamantanecarbonyl-AZT (Ada-AZT2) was stable in both plasma and brain homogenates. After intravenous bolus administration of the prodrugs, improved brain AZT levels were observed only in acetyl-AZT(C₂-AZT) and decanoyl-AZT(C₁₀-AZT). Ada-AZT2 was highly delivered to the brain in the early time point but was rapidly cleared and the generation of AZT was not observed in the brain. The favorable nature for brain-targeted prodrugs was discussed.

Toshikiro Kimura・Masahide Onogawa・

Eri Yanamoto・Yuji Kurosaki・Taiji Nakayama^{*1)},Noriko Mizobuchi・Ryoji Konishi^{*2)},Kouki Kitagawa^{*3)}

key words : azidothymidine, prodrug,
brain-targeting, AZT

azidothymidine(AZT)はヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤の一つで、エイズの予防または治療に汎用されているが、低親油性のため、脳への移行性は低い。そのため、エイズ脳症の治療効果を期待し得る量の AZT の脳への送達を考えた場合、なんらかの製剤学的アプローチが必要となる。

本研究では、化学的修飾による脳内移行性改善を目的として設計、合成した AZT の各種親油性誘導体について、脳移行性プロドラッグとしての評価を行った。

方法

(1) 試薬類

AZT は Sigma 社から購入したものを用い、表 1 に示す誘導体はすでに報告した方法¹⁾により合成したものを用いた。

(2) 実験動物

体重 240~280 g の Wistar 系雄性ラットを用いた。

(3) lipophilic index の測定

AZT と各種 AZT 誘導体の lipophilic index (log k'_0) は Yamana らの方法²⁾により、逆相 HPLC の保持時間から求めた。カラムは YMC-Pack ODS-AM(4.0×105 mm, 山村化学研究所)を、移動相は各種割合のアセトニトリル-水を用いた。

(4) *in vitro* 代謝実験

AZT および AZT 誘導体はエタノールに溶解したのち、エタノールの最終濃度が 50(v/v)% となるように生理食塩水で希釈して調製した。

① 血漿中での代謝：10 倍希釈したラット血漿 1.8 ml を 15 分間プレインキュベートしたのち、AZT 誘導体溶液 0.2 ml を添加し(最終濃度 10 nmol/ml), 37°C でインキュベートする。経時的に残存する AZT 誘導体と生成した AZT 量を測定した。

② 脳での代謝：ラットの脳に 4 倍容の等張リン酸緩衝液(pH 7.4)を加え、テフロン製ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。4°C, 3,000

^{*1)} Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University 岡山大学薬学部薬剤学教室

^{*2)} Pharmaceutical and Research Development Department, Teikoku Seiyaku Co. Ltd. 帝國製薬株式会社

^{*3)} Department of Medicinal Chemistry, Niigata College of Pharmacy 新潟薬科大学薬品製造学教室
Offprint requests to: Toshikiro Kimura, Ph. D., Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700

表1 AZT およびプロドラッグの化学構造, lipophilic index ($\log k'_0$), 定量用移動相組成

R	Compound	$\log k'_0$	Mobile phase for HPLC*
H-	AZT	0.726	85:15
CH ₃ CO-	C ₂ -AZT	1.219	75:25
CO-NH(CH ₂) ₃ -CO-	Ada-AZT1	2.196	55:45
CH ₂ -CO-	Ada-AZT2	3.094	40:60
CH ₃ (CH ₂) ₈ -CO-	C ₁₀ -AZT	3.253	40:60
CH ₃ (CH ₂) ₁₆ -CO-	C ₁₈ -AZT	4.928	15:85

* 0.1 % acetic acid : acetonitrile (v/v)

rpm で15分間遠心分離し, 得られた上清 1.8 ml に薬物溶液 0.2 ml を加え(最終濃度 10 nmol/ml), 37°Cでインキュベート, 代謝実験を行った.

(5) *in vivo* 組織移行実験

① 単回静脈内投与: ラットをウレタン麻酔下背位固定し, 左大腿静脈から各薬物を 10 μ mol/kg の投与量で投与する. 一定時間後断頭し, 血漿中および脳中の薬物を定量した.

② 定速静脈内注入法: ラットをウレタン麻酔下背位固定し, 右大腿静脈および左大腿静脈にカニューレを施した. 左大腿静脈のカニューレから薬液を定速注入し, 右大腿静脈カニューレから採血した. 定常状態到達後断頭し, 瀉血したのち各組織を摘出, 薬物量を定量した.

③ brain uptake index (BUI) 法³⁾: ラットをウレタン麻酔下背位固定し, 頸動脈にカニューレを施した. 目的物質および標準物質(amantadine)をカニューレより急速注入し, 15秒後に断頭, 脳内薬物濃度を定量した. BUI は次式により算出した.

$$BUI = \frac{C_{b,d}/C_{b,r}}{C_{i,d}/C_{i,r}}$$

ここで, C は濃度, d は薬物, r は標準物質, b は脳内, i は注射溶液内を示す.

(6) AZT および AZT 誘導体の定量法

血漿および各組織ホモジネートから酢酸エチルとジエチルエーテルの混液(1:1)で抽出, 蒸発乾固後 HPLC の移動相に溶解し, HPLC により定量した. HPLC システムは島津 LC-10A シリーズを用い, カラムは YMC-Pack ODS-AM(4.6 ×

150 mm), カラム温度は 40°C とし, UV 検出器の波長は 265 nm とした. 各薬物の定量に用いた移動相は表1に示した.

(7) amantadine の定量法

血漿および各組織ホモジネートから酢酸エチルとジエチルエーテルの混液(1:1)で抽出, 蒸発乾固後, メタノール-50 mM 磷酸緩衝液(pH9.0)(1:3) 300 μ l に再溶解し, fluorescamine アセトン溶液(2 mg/ml) 50 μ l を加えて混合して HPLC のサンプルとする. HPLC の条件は, カラムは YMC-Pack ODS-AM, 移動相は水-アセトニトリル(1:3), 蛍光検出器の波長は Ex.383 nm, Em.477 nm とした.

結果と考察

(1) lipophilic index

AZT とその誘導体の親油性のパラメータとして lipophilic index ($\log k'_0$) を求め, 表1に示した. いずれの誘導体も親油性がいちじるしく増大していることがわかる.

(2) 血漿および脳中での安定性

AZT 誘導体の血漿および脳組織中での代謝を *in vitro* で検討した結果を表2に示す. 表から明らかなように, Ada-AZT2 を除くすべての誘導体は血漿中および脳ホモジネート中で不安定で, 特に Ada-AZT1 と C₁₀-AZT は, 血漿中で非常に速やかに分解されることがわかった. C₂-AZT, C₁₀-AZT, C₁₈-AZT のうちでは C₁₀-AZT がもっとも分解されやすく, Kawaguchi らの報告⁴⁾と一致した. なお, これらの誘導体はいずれもこの分

表 2 ラット血漿および脳組織ホモジネート中でのプロドラッグの安定性

Prodrugs	$t_{1/2}$ (min)	
	10 % plasma	20 % brain homogenate
C ₂ -AZT	7.084	9.304
Ada-AZT1	0.628	7.109
Ada-AZT2	1765	670.9
C ₁₀ -AZT	0.244	1.358
C ₁₈ -AZT	12.84	32.67

解により定量的に AZT を生成するプロドラッグであることがわかった。

(3) 単回静脈内投与後の脳内移行

ラットに AZT およびその誘導体を 10 μ mol/kg の投与量で単回静脈内投与した 5, 30, 60 分後の総 AZT (AZT+誘導体) および AZT の脳中濃度をそれぞれ図 1 と図 2 に示した。図 1 から明らかなように、脳中総 AZT は Ada-AZT2 の場合、いちじるしく増大することが認められた。これは、すでに Tsuzuki らが報告した結果¹⁾と一致する。しかし、図 2 から明らかなように、Ada-AZT2 の場合、親薬物 AZT としてはほとんど存在せず、脳中における AZT の有意な増大は C₂-AZT と C₁₀-AZT でのみ認められた。

(4) Ada-AZT2 の定速静脈内注入時の脳内濃度

Ada-AZT2 の脳移行性をさらに検討するため、初期投与量 (AZT と Ada-AZT2 でそれぞれ 4.60 nmol/kg と 3.55 nmol/kg) を投与後、定速静脈内投与 (それぞれ 33.5 nmol/min/kg と 250 nmol/min/kg) し、定常状態に達した AZT の場合 75 分、Ada-AZT2 の場合 30 分後、脳内濃度を測定した。その結果、AZT では血漿中濃度 3.7 ± 0.2 nmol/ml、脳中濃度 0.12 ± 0.02 nmol/g となり、脳組織-血漿濃度比 (K_p 値) は 0.037 ± 0.005 で、脳移行性はきわめて低いことが明らかである。一方、Ada-AZT2 では血漿中濃度 1.1 ± 0.2 nmol/ml、脳中濃度 2.6 ± 0.4 nmol/g で K_p 値は 2.4 ± 0.4 となり、脳移行性がいちじるしく増大していることがわかった。しかしこの場合、脳内に AZT はほとんど認められず、脳内 AZT 濃度を高めるといふ目的は達することができなかった。

図 1 AZT あるいはプロドラッグをラットに単回静脈内投与後の脳中総 AZT の濃度変化 (投与量=10 μ mol/kg)

図 2 AZT あるいはプロドラッグをラットに単回静脈内投与後の脳中 AZT の濃度変化 (投与量=10 μ mol/kg)

同様の条件で、他の末梢組織への移行性を図 3 に示した。Ada-AZT の K_p 値は肝臓を除く臓器において 1 を越えたのに対して、AZT は腎臓でのみ 1 以上の K_p 値を示した。Ada-AZT2 は肝臓と腎臓を除くすべての末梢臓器で AZT より高い K_p 値を示したことから、adamantane 導入により、脳のみならず他の末梢臓器への移行性も増大することがわかった。この原因は、adamantane 導入により親油性が増大した結果、受動拡散による組織への移行が増大したものと考えられる。また、Ada-AZT2 の脳への移行性は他の末梢臓器にくらべて大きく、K_p 値は AZT の 64 倍であったことから、adamantane の導入が特に脳移行性を

図3 Ada-AZT2 および AZT の各臓器における定常状態組織-血漿中濃度比 (K_p)
数字は Ada-AZT2 と AZT の K_p 値の比を示す。

増大させることがわかった。

adamantane の脳移行性に関して, rimantadine および amantadine が特殊輸送機構により血液-脳関門を通過することが報告されている⁵⁾。そこで, Ada-AZT2 の脳移行に特殊輸送機構の関与を検討するため, amantadine を $2.5 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$ 同時に定速注入して Ada-AZT2 の脳移行性を測定したが, K_p 値に変化が認められず, Ada-AZT2 の脳移行において特殊輸送機構の関与はないものと思われる。

(5) C_{10} -AZT の脳移行機構

C_{10} -AZT 単回静脈内投与後の脳中には AZT 移行の増大が認められたが, 未変化体は検出できなかった。そこで, C_{10} -AZT の脳移行機構を明らかにするため, BUI 法による検討を行った。その結果, amantadine を標準物質とした場合の BUI は 192.2 ± 11.8 で, Ada-AZT (252.9 ± 32.9) と同様の脳移行性であることが明らかとなった。また, C_{10} -AZT 頸動脈内投与実験では, 5 分後の脳中 AZT は静脈内投与後の $1.5 \pm 0.3 \text{ nmol}/\text{g}$ から $37.1 \pm 12.6 \text{ nmol}/\text{g}$ へといちじるしく増大したが, 未変化体は検出できなかった。

これらの結果から, C_{10} -AZT は高い脳内移行能力を持つものの血漿中での分解が速く, 静注では十分量の C_{10} -AZT が脳内に到達できなかったこと, 脳内に到達した C_{10} -AZT は脳内で AZT を

図4 Verapamil, Quinidine および Probenecid を同時静脈内投与後の脳中 AZT 濃度変化
AZT および併用薬の投与量 $= 10 \mu\text{mol}/\text{kg}$

図5 C_{10} -AZT 静脈内投与後の脳中 AZT 濃度に及ぼす Quinidine 併用の影響
 C_{10} -AZT および quinidine の投与量 $= 10 \mu\text{mol}/\text{kg}$

再生することがわかった。

(6) プロドラッグによる AZT の脳移行改善の条件

プロドラッグが脳内に移行するためには, 親油性が必要である。プロドラッグが血漿中で比較的安定な場合, そのままの形で脳内に速やかに移行する。脳移行後脳内で AZT への分解が速ければ, 脳中 AZT が増大する。一方, プロドラッグが脳内で安定であれば, 再度プロドラッグの形のままで脳外へ移行してしまい, 脳内で AZT は得られない。Ada-AZT2 はこの一例である。血漿中で不安定なプロドラッグは, そのままの形で脳内に移

行する量は少ないが、脳内で速やかに AZT が再生できれば有用である可能性がある。C₁₀-AZT の場合、脳中 AZT を高めることができたが、十分な脳中 AZT 濃度を得るには血漿中での安定性が不足しているといえることができる。

(7) AZT の脳からの排出機構

AZT は親水性であるため、脳内に移行させればロックインされ、脳から血液側への移行は制限されると予測されたが、AZT の滞留性は低かった。そこで、AZT の脳からの排出機構について検討を加えた。Dykstra ら⁶⁾はマイクロダイアリシスによる研究で、AZT のラット脳から血液側へ能動的な排出機構が存在することを示し、Masereeuw ら⁷⁾は AZT のラット CSF から血液への輸送に有機陰イオン輸送系が関与しているが、培養ウシ脳血管内皮細胞の輸送は受動拡散であったことから、輸送系は脈絡叢に存在するとしている。

図 4 は、P-糖蛋白により輸送される verapamil および quinidine、有機陰イオン輸送系の阻害剤 probenecid を AZT と同じ 10 μ mol/kg で併用単回静脈内投与したときの脳中濃度である。図から明らかなように、verapamil および quinidine 併用により脳中 AZT 濃度が増大した。両薬物は AZT のラット血漿蛋白との結合に影響せず、図 4 にみられる AZT の脳中濃度の上昇は、両薬物が AZT の脳からの排出を阻害した結果と思われる。probenecid は、この投与量では有意な効果を示さなかった。

図 5 は、AZT の脳中濃度を増加させることができた C₁₀-AZT に quinidine を併用した場合の脳中 AZT 濃度を示している。図から明らかなように、C₁₀-AZT 単独投与時にくらべていちじるしく脳中 AZT 濃度を増大させることができた。

これまでも AZT の脳指向性プロドラッグが報告されているが⁸⁾、脳中への滞留が短いように思われる。AZT に対する脳からの排出機構の存在がその原因と考えられる。脳中に AZT を長時間滞留させるためには、この点を克服することが重要である。

文 献

- 1) Tsuzuki, N., Hama, T., Kawada, M., Hasui, A., Konishi, R. et al.: Adamantane as a brain-directed drug carrier for poorly absorbed drug. 2. AZT derivatives conjugated with the 1-adamantane moiety. *J. Pharm. Sci.* 83: 481-484, 1994.
- 2) Yamana, T., Tsuji, A., Miyamoto, E., Kubo, O.: Novel method for determination of partition coefficients of penicillins and cephalosporins by high pressure liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* 66: 747-749, 1977.
- 3) Oldendorf, W.H.: Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am. J. Physiol.* 221: 1629-1639, 1971.
- 4) Kawaguchi, T., Ishikawa, K., Seki, T., Juni, K.: Ester prodrugs of zidovudine. *J. Pharm. Sci.* 79: 531-533, 1990.
- 5) Spector, R.: Transport of amantadine and rimantadine through the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244: 516-519, 1988.
- 6) Dykstra, K.H., Arya, A., Arriola, D.M., Bungay, P. M., Morrison, P.F., Dedrick, R.L.: Microdialysis study of zidovudine (AZT) transport in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267: 1227-1236, 1993.
- 7) Masereeuw, R., Jaehde, U., Langemeijer, M.W.E., deBoer, A.G., Breimer, D.D.: *In vitro* and *in vivo* transport of zidovudine (AZT) across the blood-brain barrier and the effect of transport inhibitors. *Pharm. Res.* 11: 324-330, 1994.
- 8) Brewster, M.E., Pop, E., Braunstein, A.J., Pop, A.C., Druzgala, P. et al.: The effect of dihydronicotinate N-substitution on the brain-targeting efficacy of a zidovudine chemical delivery system. *Pharm. Res.* 10: 1356-1362, 1993.