有機硝酸化合物の体内動態と薬理効果における脱ニトロ化反応の役割

畑中 朋美

Role of Denitration in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Organic Nitrates

Tomomi HATANAKA

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama

Summary: Role of denitration in the pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of organic nitrates was reviewed. The PK/PD relationship following i.v. bolus injection of stereoisomeric organic nitrates can be described using simple compartment and sigmoidal Emax models. Because the nitrates are prodrugs of nitric oxide and eliminate mainly as denitrated metabolites, both potency and duration of vasodilation depend on the extent of denitration. At present, the mechanism of nitrate tolerance remains poorly understood. However, the most of the important hypotheses are counter-regulative, so that the denitration may play an important role in the development of tolerance. It is desired to establish the PK/PD relationship of organic nitrates involving tolerance period and improve nitrate-therapy based on the relationship.

Key words: Organic nitrates, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Tolerance, Denitration, Nitric oxide

はじめに

ニトログリセリン(GTN)をはじめとする有機硝酸化合物が狭心症の治療に導入されたのは 19 世紀に遡るが、現在でも最も重要な狭心症治療および予防薬であり続けている¹⁾。β遮断薬や Ca 拮抗剤のような他の狭心症治療薬とは異なり、選択的に静脈を弛緩させることにより前負荷を減少させるため²⁾、様々な剤形あるいは投与経路から虚血性心疾患に対して広く利用されている³⁾。しかし、この長くかつ広範な臨床利用の歴史にもかかわらず、硝酸化合物療法は今だ試行錯誤の段階にある。主な原因は急速な薬理学的耐性の発現にあるが、この耐性をどのような戦略により克服するかは個々の医師の裁量に委ねられているのが現状である⁴⁾。最適な治療効果を引き出す投与方法を理論的に構築するためには、有機硝酸化合物の体内濃度と薬効強度を耐性発現時も含

めて定量的に関連づける必要があり、pharmacokinetic (PK)/pharmacodynamic (PD) 相関の確立が望まれている。

現在、最も汎用されている有機硝酸化合物には GTN の他に硝酸イソソルビド (ISDN) と一硝酸イソソルビド (5-ISMN) があるが (Fig. 1)、これらの薬物は本質的にプロドラッグであり、治療効果を発揮するためには活性因子である一酸化窒素 (NO) を遊離しなければならない⁵⁾。また、これらの薬物の多くは脱ニトロ化代謝物として排泄されるため⁶⁾、脱ニトロ化反応は薬効の強度と持続時間双方を制御している可能性がある。さらに、耐性の原因は現時点では不明ではあるが、その有力な説の多くは counter-regulative なものであり⁴⁾、薬効発現の鍵となる脱ニトロ化反応との関連には興味深いものがある。

そこで、本稿では有機硝酸化合物の薬理効果と体内動

——はたなか ともみ——

畑中朋美：富山医科薬科大学薬学部薬剤薬理学(薬剤学)，助手，薬学博士。

1987 年富山医科薬科大学大学院薬学研究科博士前期課程修了後，城西大学薬学部助手に採用され，1992 年富山医科薬科大学薬学部教務職員を経て，1993 年より現職。本学赴任後，小泉保教授の御指導のもと学生時代に取り組んでいた PK/PD 研究を再開し，基礎と臨床を繋ぐ要の役割を果たしたいと考えている。

態における脱ニトロ化反応の役割を、我々の ISDN ならびに 5-ISMN の立体異性体を用いた研究結果を中心に紹介する。また、耐性発現機構との関連性についても触れ、有機硝酸化合物の PK/PD 相関確立の可能性、さらには最適な投与方法について私見を述べる。

有機硝酸化合物の PD における 脱ニトロ化の役割

Fig. 2 に有機硝酸化合物の血管拡張機構の概要を示した。循環血液中の硝酸化合物は血管平滑筋細胞内に浸透した後、脱ニトロ化とそれに続く NO の遊離を含む一連の生体内変化を受ける⁷⁾。NO は血管内皮細胞で生成される内因性の弛緩因子でもあり、heme site との相

Fig. 1 Chemical structures of organic nitrates

互作用を介して guanylate cyclase を活性化し、GTP から cGMP への変換を促進して血管拡張を引き起こす⁸⁾。NO 生成以降の反応は全ての硝酸化合物で共通であるため、化合物間の薬効強度の違いは脱ニトロ化の程度に依存すると考えられる。

我々は ISDN と 5-ISMN にはニトロ基と水酸基の立体配座、すなわち環に対して外向きの *exo* 位と内向きの *endo* 位のみが異なる立体異性体が存在することに着目し (**Fig. 1**)、これらの血圧降下作用をラットで比較した。個々の硝酸化合物を 50, 100 もしくは 200 mg/kg 急速静脈内投与した後、経時的に血漿中濃度を測定するとともに、平均動脈圧のベースラインレベルとの差 (Δ MAP) をモニタリングした。5-ISMN をはじめとする一硝酸化合物投与後の Δ MAP と血漿中濃度の関係には最大薬効 ($E_{\max}$) は認められなかったが、対数線形モデルでうまく関連づけることができた。一方、ISDN 等の二硝酸化合物投与後の薬効は活性代謝物である一硝酸化合物との相加反応であると仮定し、先に得られた一硝酸化合物の PD パラメータを用いてシグモイド $E_{\max}$ モデルにより解析できた (**Fig. 3**)。これまで困難と思われていた有機硝酸化合物の PK/PD 相関も⁹⁾、初回投与後短期間であれば確立できる可能性が示唆された。

PK/PD 解析の結果得られた Hill 係数と $E_{\max}$ はそれぞれ約 1 および 50 mmHg と投与した化合物にかかわらず一定値を示し、有機硝酸化合物は脱ニトロ化を介した共通の血管拡張機構を有することを支持する結果となった。一方、EC₅₀ の値は化合物間で異なり、一硝酸化合物 (EC_{50_{mono}}) より二硝酸化合物 (EC_{50_{di}}) のほうが、また *exo* 位にあるニトロ基、さらには水酸基の数が多い異性体のほうが高い血管拡張作用を有することが明らかとなった (**Table I**)。同様の構造-活性相関は既に Lan-

Fig. 2 Mechanism of vasodilation by organic nitrates
R-ONO₂: organic nitrate, NO: nitric oxide.

Fig. 3 Typical time courses of plasma concentration and mean arterial pressure in rats receiving a single i.v. dose of 100 mg/kg ISDN
The smooth solid lines represent nonlinear least-squares fit of data to the PK/PD model.

Table I PK/PD parameters of stereoisomeric organic nitrates

Parameter	IIMN	IMMN	2-ISMN	5-ISMN
	IIDN	IMDN	ISDN	
CL_{mono} ($mL \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$)	32.0 ± 7.0	12.6 ± 3.0	9.03 ± 2.00	6.57 ± 0.35
CL_{di} ($mL \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$)	137. $\pm 7.$	45.0 ± 12.0	20.4 ± 3.1	88.9 ± 13.7
$EC50_{mono}$ ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	77.9 ± 19.6	254. $\pm 101.$	184. $\pm 75.$	225. $\pm 92.$
$EC50_{di}$ ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	1.39 ± 0.68	4.67 ± 2.15	1.86 ± 1.20	

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 9 rats

genhoff heart preparation を用いた実験系でも報告されており¹⁰⁾, PK/PD 解析により *in vitro* で観察された現象が生理学的条件下でも起きていることが確認できた.

化学量論的な原理に基づけば, NO を二分子生成する二硝酸化合物は一分子生成する一硝酸化合物の二倍の薬理活性を持つと予想されるが, 二硝酸化合物の相対的な活性は遥かに高い (Table I). 有機硝酸化合物は血液から血管平滑筋細胞内へ移行して始めて薬効発現し得るため⁷⁾, 脂溶性が高く細胞内へ移行しやすい二硝酸化合物ほど相対的に高い薬理効果を示すと考えられる¹¹⁾. GTN の ISDN 以上に高い血管拡張作用もその一部は細

胞への移行性の高さに起因すると思われる¹⁰⁾.

一方, 立体異性体間には大きな極性の差はなく¹¹⁾, また $EC50$ と分配係数の間には関連性が認められないことから, これらの薬効強度の差は脱ニトロ化酵素に対する親和性を反映していると推察される (Table I). この反応に介在する酵素は同定されておらず, glutathione S-transferase, cytochrome P-450, microsomal enzyme 等様々な酵素の可能性が指摘されている¹²⁾. しかし, いずれの酵素が介在するにせよ, *endo* 位にあるニトロ基は隣接する環にある酸素の lone-pair 電子と相互作用することが知られており¹³⁾, *exo* 位の置換基より酵素の攻撃を受け難いと考えられる. これらの情報を利用すれば, 脱ニトロ化の受けやすさを基準に, 現在市販されている硝酸化合物より血管拡張作用の強い (あるいは弱い) 化合物をデザインすることも可能と思われる.

有機硝酸化合物の PK における 脱ニトロ化の役割

GTN や ISDN, 5-ISMN の体内動態は 1970 年代から広範に研究され, 既に卓越した総説がいくつか発表されている^{6,9)}. 5-ISMN の一部が直接グルクロン酸抱合を受けることを除き, これらの化合物はヒトにおいてもラットにおいても脱ニトロ化代謝物とその抱合体して排泄されるため^{6,14)}, 脱ニトロ化の程度は薬効強度のみならず体内動態, ひいては薬効の持続時間にまで影響を与えることが予測される.

我々は既に PK 特性が良く知られている ISDN と 5-ISMN に加え, それらの立体異性体の体内動態をラットにおいて比較検討した. 一硝酸化合物の血漿中濃度は静注後指数関数的に衰退し, 50–200 mg/kg の投与量範囲のデータは線形の 1-コンパートメントモデルにより記述できた. 一方, 二硝酸化合物は投与後二相性の急速な消失を示したが, それに伴って活性代謝物である一硝酸化合物が速やかに血漿中に出現し, その後ゆるやかに消失した (Fig. 3). これらの体内動態は, 先に得られた一硝酸化合物の PK パラメータを用いて, 二硝酸化合物は一硝酸化合物への代謝のみにより消失すると仮定した 2-コンパートメントモデルにより説明できた. 置換基の立体配座とは無関係に一および二硝酸化合物の体内挙動はそれぞれ共通の PK モデルで表されることが明らかとなった.

全ての二硝酸化合物のみかけの分布容積はラットの体液量 (900 ml/kg) にほぼ一致し¹⁵⁾, 比較的高くかつ異性体間で類似した極性を反映する結果となった¹¹⁾. しかし, 全身クリアランス (CL_{mono}) は異性体間で有意に異なり, IIMN, IMMN, 2-ISMN, 5-ISMN の順に低下した (Table I). 二硝酸化合物の一硝酸化合物へ代謝クリアランス (CL_{di}) はラットの肝血漿流量 (20 ml/min/kg) を

超え¹⁶⁾、また同じ立体配座で脱ニトロ化され得る一硝酸化合物の全身クリアランスより常に高い値を示した。異性体間で比較すると、*endo* 位より *exo* 位のニトロ基が一つより二つあるほうが高いクリアランス値を示し、薬効強度の高い異性体ほど代謝されやすい傾向が認められた。

有機硝酸化合物はほとんど代謝物として排泄されるため^{6,14)}、二硝酸化合物の高い代謝クリアランスは、脂溶性の高さに起因する高い組織移行性を反映しているものと考えられる¹¹⁾。有機硝酸化合物の血管における脱ニトロ化酵素が肝臓を含む他の臓器と一致するかは明らかではないが¹²⁾、二硝酸化合物の一硝酸化合物への代謝も脱ニトロ化反応であるため、薬効強度の立体選択性に関する考察が代謝クリアランスにもそのまま適応できる。一方、一硝酸化合物は脱ニトロ化の他にグルクロン酸抱合を受ける^{6,14)}。この抱合の割合は他の異性体では10%前後であるのに対し、IMMNのみ43%と著しく高い¹⁴⁾。*endo* 位の水酸基も同じ環内の酸素との水素結合を介して分子内相互作用することが知られているが¹⁷⁾、この作用はいわゆる SN_2 機構により backside attack するグルクロン酸抱合にとっては有利である。*endo* 位のニトロ基、水酸基双方の分子内相互作用がIMMNの例外的に高いグルクロン酸抱合、ならびに全身クリアランスを招くものと考えられる。

IMMNの例外はあるものの、一般にPK, PDともに脱ニトロ化反応に対する依存度が高いため、血管拡張作用の強い硝酸化合物ほど体内からの消失が早く、薬効の持続時間が短い傾向が認められた。このことから、異性体間で中間のPK, PD特性を有するISDNと5-ISMNが現在臨床的に汎用されていることも理解できる。しかし、PKは剤形変更等によってある程度制御可能であり、以下に述べる耐性発現を考慮すれば、現在の治療法が最善であるとは言い難い。投与直後のみならず耐性時をも含めたPK/PD相関の必要性が再認識される。

有機硝酸化合物の耐性発現における脱ニトロ化の役割

有機硝酸化合物の長期治療時の耐性発現は決して新しい問題ではなく、狭心症治療への導入直後から知られている現象であった^{1,4)}。しかし、临床上その重要性が認識されるようになったのは1980年代で、GTNの経皮パッチの上市と時を同じくする。この現象の統一的な発現機構は現在に至るまで確立されていない。そのため、経時的なdose escalation、投与の中断、他剤との併用等、医師の判断により様々な対処法が試みられている。

耐性発現機構に関する数多くの仮説の中で最も古くから研究されてきたものは、NOへの生体内変化に必要な血管内の還元型thiol基が枯渇するという説である¹⁸⁾。

また、硝酸化合物の薬理効果に対する生理的反応として耐性を捉える動きもあり、reninのような神経ホルモンの活性化や血管内容積の増加に起因するとの説が提案されている^{19,20)}。しかし、これらの機構を打ち消すthiol化合物やACE阻害剤、利尿剤によって必ずしも耐性は克服できていない^{1,4)}。近年、血管内皮細胞内のsuperoxide anionの産生が硝酸化合物により増大し、NOのbioavailabilityを低下させるとするfree radical説が注目を集めているが²¹⁾、その他にも代謝酵素のdown-regulation, guanylate cyclaseの感受性の低下、endothelinの関与等様々な説が提案され続けており、耐性発現機構に関する研究は現在もお混沌としている^{1,4)}。

有機硝酸化合物の耐性機構が明らかにされていない現在、耐性時も含めたPK/PD相関の確立は不可能であるかのように思われる。しかし、提案されている有力な仮説のほとんどはcounter-regulativeな機構であり、耐性は脱ニトロ化、あるいは血管拡張の程度に依存して発現することを示唆している。既に、心疾患モデルラットにおけるGTN投与後12時間以内の耐性の解析に血管拡張作用に対してcounter-regulativeなPDモデルが用いられ、解析結果に基づいた投与計画により耐性克服に成功している²²⁾。このモデルが長期に渡る耐性にも適用できるのか、あるいは他の硝酸化合物や患者にも適用可能か、さらなる検証が必要であろう。また、counter-regulationが薬効発現までのどの過程(たとえば脱ニトロ化、cGMPへの変換、あるいは筋弛緩そのもの)にかかるのか明らかにする必要もあろう。さらに、精度の高いPK/PDモデルを構築し、理論的に適切な投与法を確立するためには、耐性機構に関する研究の一層の推進が望まれる。

おわりに

有機硝酸化合物のPK/PD相関は短期間ではあるが十分に確立可能であり、PKおよびPD特性ともに脱ニトロ化反応に大きく依存することが明らかとなった。したがって、脱ニトロ化の受けやすさを基準に薬効の強度や持続時間の異なる硝酸化合物を新たにデザインできると考えられる。耐性時も含めたPK/PD相関の確立にはさらなる研究成果を待たねばならないが、既にある程度の成功を納めており、確立の時は近いと著者は信じている。PK/PD相関の確立により硝酸化合物に要求される最適なPK/PD特性が明らかとなれば、それに応じた投与法あるいは新たな化合物の合成へと硝酸化合物治療の新たな展開が期待できる。

謝 辞：本研究を遂行に当って御指導を賜りました富山医科薬科大学小泉 保名誉教授ならびに片山和憲助教授に深く感謝致します。また、データ採取に御協力頂いた富山医科薬科大

学薬学部薬剤薬理学(薬剤学)教室の各位に深謝致します。

文 献

- 1) Parker, J. D. and Parker, J. O.: Nitrate therapy for stable angina pectoris. *N. Engl. J. Med.*, **338**: 520-531 (1998).
- 2) Bassenge, E. and Stewart, D. J.: Effects of nitrates in various vascular sections and regions. *Z. Kardiol.*, **75**: 1-7 (1986).
- 3) Ahlner, J., Andersson, R. G., Torfgard, K. and Axelsson, K. L.: Organic nitrate esters: Clinical use and mechanisms of actions. *Pharmacol. Rev.*, **43**: 351-423 (1991).
- 4) Thadani, U.: Nitrate tolerance, rebound, and their clinical relevance in stable angina pectoris, unstable angina, and heart failure. *Cardiovasc. Drug Ther.*, **10**: 735-742 (1996).
- 5) Feelisch, M. and Noack, E.: Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.*, **139**: 19-30 (1987).
- 6) Bogaert, M. G.: Clinical pharmacokinetics of nitrates. *Cardiovasc. Drug Ther.*, **8**: 693-699 (1994).
- 7) Chung, S. J. and Fung, H. L.: Identification of the subcellular site for nitroglycerin metabolism to nitric oxide in bovine coronary smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253**: 614-619 (1990).
- 8) Ignarro, L. J., Cirino, G., Casini, A. and Napoli, C.: Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: An overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **34**: 879-886 (1999).
- 9) Thadani, U. and Whitsett, T.: Relationship of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the organic nitrates. *Clin. Pharmacokin.*, **15**: 32-43 (1988).
- 10) Noack, E.: Investigation on structure-activity relationship in organic nitrates. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **6**: 583-586 (1984).
- 11) Hatanaka, T., Suzuki, R., Katayama, K. and Koizumi, T.: Stereoselective skin permeation of organic nitrates: application of partitioning and porous transport theories. *Int. J. Pharm.*, **168**: 199-208 (1998).
- 12) Bennett, B. M., McDonald, B. J., Nigam, R. and Simon, W. C.: Biotransformation of organic nitrates and vascular smooth muscle cell function. *Trends Pharmacol. Sci.*, **15**: 245-249 (1994).
- 13) Hayward, L. D., Livingstone, D. J., Jackson, M. and Csizmadia, V. M.: The stereochemistry of nitrate esters. II. Symmetric stretching frequencies of the nitrate group in nitrate esters of 1,4: 3,6-dianhydrohexitols (4,8-dihydroxy-*cis*-2,6-dioxabicyclo [3.3.0]octanes). *Can. J. Chem.*, **45**: 2191-2194 (1967).
- 14) Tzeng, T. B. and Fung, H. L.: Pharmacokinetics of stereomeric 1,4: 3,6-dianhydrohexitol mononitrates in rats. *Pharm. Res.*, **10**: 22-27 (1993).
- 15) Rothwell, N. J. and Stock, M. J.: *In vivo* determination of body composition by tritium dilution in the rat. *Br. J. Nutr.*, **41**: 625-628 (1989).
- 16) Bischoff, K. B., Dedrick, R. L., Zaharko, D. S. and Longstreth, J. A.: Methotrexate pharmacokinetics. *J. Pharm. Sci.*, **60**: 1128-1133 (1971).
- 17) Anteunis, M. and Verhegghe, G.: Configurational and conformational insights on *exo*- and *endo*-1,4: 3,6-dianhydroglucitol mononitrate. *Org. Magn. Resonance*, **3**: 693-701 (1971).
- 18) Needleman, P. and Johnson, E. M. Jr.: Mechanism of tolerance development to organic nitrates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **184**: 709-715 (1973).
- 19) Parker, J. O. and Parker, J. D.: Neurohormonal activation during nitrate therapy: A possible mechanism for tolerance. *Am. J. Cardiol.*, **70**: 93B-97B (1992).
- 20) Dupuis, J., Lalonde, G., Lemieux, R. and Rouleau, J. L.: Tolerance to intravenous nitroglycerin in patients with congestive heart failure: Role of increased intravascular volume, neurohumoral activation and lack of prevention with N-acetylcysteine. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **16**: 923-931 (1990).
- 21) Münzel, T., Sayegh, H., Freeman, B. A., Tarpey, M. M. and Harrison, D.G.: Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance: A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J. Clin. Invest.*, **95**: 416-425 (1995).
- 22) Bauer, J. A., Balthasar, J. P. and Fung, H. L.: Application of pharmacodynamic modeling for designing time-variant dosing regimens to overcome nitroglycerin tolerance in experimental heart failure. *Pharm. Res.*, **14**: 1140-1145 (1997).