COMMENTARY

トキシコキネティックス/遺伝子工学/MS による
ソリブジン薬害発生のメカニズムの解明Toxicokinetic, Gene-technological, and Mass Spectrometric
Approaches to the Mechanism of Lethal Interactions
between the New Antiviral Drug, Sorivudine, and
5-Fluorouracil Prodrugs in Humans渡部 烈^{*a), b)}・小倉健一郎^{a)}

Tadashi WATABE and Kenichiro OGURA

(Received March 19, 2002; Accepted March 27, 2002)

In 1993, there were 18 acute deaths in Japanese patients who had the viral disease, herpes zoster, and were administered with a new anti-viral drug, sorivudine (SRV, 1- β -D-arabinofuranosyl-(*E*)-5-(2-bromovinyl)uracil). All the dead patients were receiving a 5-fluorouracil (5-FU) prodrug for anti-cancer chemotherapy when they were administered with SRV. Studies on toxicokinetics in rats and on their hepatic dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), a rate-limiting enzyme for the 5-FU catabolism in the rat and human, strongly suggested that in the patients who received both SRV and 5-FU prodrug, tissue levels of highly toxic 5-FU increased extremely as a result of irreversible inactivation of DPD in the presence of NADPH by 5-(2-bromovinyl)uracil (BVU), a metabolite formed from SRV by gut flora in rats and humans. Recombinant human (h) DPD was also irreversibly inactivated by [14 C]BVU in the presence of NADPH. MALDI-TOF MS analysis of radioactive tryptic fragments from the radiolabeled and inactivated hDPD demonstrated that a Cys residue located at position 671 in the pyrimidine-binding domain of hDPD was modified with an allyl bromide type of reactive metabolite, dihydro-BVU.

1. はじめに

ソリブジン薬害は、1993年にわが国で起きた、薬の服み合わせとしては世界最大の薬害であった。抗ウイルス（抗带状疱疹）新薬として市販されたソリブジンは、発売開始後わずか40日以内に15人の急性致死者を出し、ソリブジンの第II相臨床試験においても3人の死者を出していたことが後でわかった。亡くなられた18名の患者はいずれも抗癌薬である5-フルオロウラシル（5-FU）製剤を主として術後の癌再発予防の目的で毎日服用していた。带状疱疹は免疫機能が低下した高齢者や抗癌薬の投与によって同機能が低下した患者に多発する疾患である。5-FU製剤以外の抗癌薬による治療を受けていて、ソリブジンを服用した患者およびソリブジンのみを服用した患者からは1人の中毒者や死者も出ていない。

この薬害は、筆者らがすでに総説において指摘しているように確実に防止できたという点で全くの人災であった^{1)~3)}。この薬害を契機にわが国の新薬の開発と承認の体

Fig. 1. Plasma and tissue AUC of 5-fluorouracil (5-FU) in rats orally treated with its prodrug, 5-FU-tetrahydrofuran (FT), or FT and sorivudine (SRV) once daily for 6 days. ■, FT (60 mg/kg/day); □, FT (60 mg/kg/day)+SRV (30 mg/kg/day).

*a) 東京薬科大学薬学部 (〒192-0392 八王子市堀之内 1432-1)

School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science (1432-1 Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-0392, Japan)

b) 富山医科薬科大学と漢薬研究所 (〒930-0194 富山市杉谷 2630)

Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University (2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan)

Fig. 2. Microscopic profiles of the intestine of rats on day 6 after treatment with vehicle (A), FT+SRV (B), and FT or SRV alone (C) once daily. Doses of the drugs were the same as shown in Fig. 1.

Fig. 3. Number of CFU-GM colony in the bone marrow of rats treated with FT alone (□), SRV alone (▨), and FT and SRV (■) once daily for 6 days. Doses of the drugs were the same as shown in Fig. 1.

制は大きく変わるようになった。

2. ラットで再現できたソリブジンと 5-FU 製剤の併用による急性致死^{3)~5)}

ソリブジン薬害で亡くなった 5-FU 製剤服用中の患者の多くは、いずれもソリブジン服用開始後 3~4 日で激しい下痢を起こし、摂食不能となり、ソリブジンの服用を中止したにもかかわらず、10 日前後で死に至った。急死直前の患者の白血球と血小板数は激減していた。この中毒死は、実験動物における 5-FU 製剤の過量投与によるものと酷似していた。

死亡した患者の多くが服用していたとされる 5-FU のプロドラッグであるテガフル (FT) とソリブジンをラットに 1 日 1 回反復併用経口投与すると、投与開始後 3~4 日目でラットは下血を伴う激しい下痢を起こし、摂餌量はゼロとなった。そして 10 日目までに、すべてのラットが死に至った。反復併用投与と同用量の FT またはソリブジン

Fig. 4. White blood cell (WBC) and platelet (PTL) counts on day 6 in rats treated once daily with FT alone or FT and SRV. Doses of the drugs were the same as shown in Fig. 1.

の反復単独投与によっては、投与開始後 20 日を経てもラットには何らの異常も認められなかった。明らかにラットの死はソリブジン薬害での死亡患者と同様にソリブジンと 5-FU プロドラッグの併用反復投与で引き起こされたのである。

両薬の反復併用投与によりラットの血漿、肝、小腸、および骨髄中の 5-FU レベルは 1 日目ですでに著しく増大しており、致死量を超える FT の投与がなされたと同様の結果となっていた (Fig. 1)。両薬の反復経口投与 6 日目の腸管粘膜は著しい萎縮像を示しており、下血を伴うラットの激しい下痢の原因が判明した (Fig. 2)。骨髄の増殖可能な細胞 (CFU-GM) 数は、両薬の反復投与後 2 日目ですでに激減しており、4 日目ではほぼゼロとなり、回復不可能な

Fig. 5. Relationship between radioactivity incorporation into and inactivation of recombinant human dihydropyrimidine dehydrogenase (hDPD) preincubated with $[^{14}\text{C}]$ 5-(2-bromovinyl)uracil (BVU) in the presence of NADPH. hDPD activity (●) was determined by using 5-FU as a substrate after preincubation with $[^{14}\text{C}]$ BVU in the presence of NADPH. Radioactivity incorporated into hDPD (○) was measured after isolation of the enzyme protein from the preincubation mixtures. Preincubations were also carried out in the presence of the 10 mM thiol (△), cysteine, 2-mercaptoethanol, dithiothreitol, or glutathione.

骨髄損傷に陥っていた (Fig. 3). これに伴い、ラットの血中の白血球と血小板数は6日目には激減していた (Fig. 4).

抗帯状疱疹薬としてのソリブジンを開発した日本商事 (株) の研究者達によって、ソリブジンはヒトにおいても、ラットにおいても腸内で細菌によって一部が分解され、抗ウイルス作用をもたない5-(2-ブロモビニル)ウラシル (BVU) を生成し、これが吸収されて、肝を経て血中に出現することが明らかにされている。筆者らも、ソリブジンを経口投与したラットで、血中および肝中に BVU が存在することを確認した。あわせて、ラット肝の5-FUを代謝分解する酵素ジヒドロピリミジン・デヒドロゲナーゼ (DPD) の活性が著しく低下していることを確認した。

3. ラットおよびヒト DPD の BVU による不可逆的阻害^{6), 7)}

未処理ラットの肝細胞質より、DPD を単離精製し、NADPH 共存下で $[^{14}\text{C}]$ BVU とインキュベートすると、DPD の5-FU代謝活性は失われ、同時に DPD への放射能の取り込みが起こった。全く同様のことが大腸菌中で遺伝子工学的手法によって発現させたヒト DPD (hDPD) 精製標品についても認められた (Fig. 5)。なお、NADPH 不在下では、ラット DPD および hDPD は $[^{14}\text{C}]$ BVU によって失活せず、放射能でラベルされなかった。ソリブジン自身は NADPH 存在下で DPD を不活性化しなかった。以上の

結果は、BVU がラット DPD および hDPD によって還元されるとアリルプロミド型の反応性に富む親電子性代謝物ジヒドロ-BVU となり、直ちに DPD のピリミジン結合部位のアミノ酸残基の求核性官能基と共有結合を形成して、基質 5-FU を受容できなくなることを示唆している。

4. MALDI-TOF MS によるヒト DPD のピリミジン結合部位の決定とソリブジン薬害メカニズムの解明^{3), 7)}

$[^{14}\text{C}]$ BVU によって NADPH 共存下完全失活した hDPD の放射能はゲルろ過 HPLC によっても、SDS-PAGE によっても酵素タンパク質から除去されなかった。 $[^{14}\text{C}]$ BVU でラベルされた放射性 hDPD をトリプシン処理し、放射性ペプチドフラグメントを HPLC で単離精製すると、2種の放射性ペプチド I および II が得られた (Fig. 6)。それぞれの放射性ペプチドの N-末端アミノ酸配列分析の結果は、両ペプチドが hDPD の同じアミノ酸配列の部分から切り出されたものであり、それらの中に含まれる ^{671}Cys 残基が見当たらないことを示していた (Table 1)。

両放射性ペプチドの MALDI-TOF MS による分析の結果、hDPD の ^{671}Cys に結合していた反応性に富む BVU

Table 1. Amino Acid Sequence of Radioactive Peptides I and II Derived by Tryptic Digestion from hDPD Inactivated by the Incubation with $[^{14}\text{C}]$ -BVU in the Presence of NADPH

Cycle	Peptide I		Cycle	Peptide II		hDPD ^{b)}
	Amino acid	pmol		Amino acid	pmol	
1	Lys	65.9				^{656}Lys
2	Ser	29.6	1	Ser	25.2	Ser
3	Glu	27.5	2	Glu	8.8	Glu
4	Asp	19.9	3	Asp	10.3	Asp
5	Ser	14.7	4	Ser	6.0	Ser
6	Gly	24.4	5	Gly	10.6	Gly
7	Ala	21.5	6	Ala	5.9	Ala
8	Asp	11.3	7	Asp	5.8	Asp
9	Ala	24.6	8	Ala	6.4	Ala
10	Leu	14.2	9	Leu	5.3	Leu
11	Glu	9.9	10	Glu	2.6	Glu
12	Leu	18.6	11	Leu	7.1	Leu
13	Asn	14.5	12	Asn	5.3	Asn
14	Leu	18.7	13	Leu	0.4	Leu
15	Ser	6.9	14	Ser	2.2	Ser
16	X ^{a)}	—	15	X ^{a)}	—	^{671}Cys
17	Pro	7.5	16	Pro	2.2	Pro
18	His	0.6	17	His	0.2	His
19	Gly	8.9	18	Gly	5.6	Gly
20	Met	3.6	19	Met	1.3	Met
21	Gly	12.4	20	Gly	6.1	Gly
22	Glu	2.1	21	Glu	1.0	Glu
23	Arg	0.6	22	Arg	0.9	^{678}Arg

^{a)} This residue was not identified. About 90% of radioactivity of radiolabeled peptides I and II were eluted at cycles 16 and 15, respectively, and most of the remainder at next two cycles.

^{b)} Amino acid sequence of hDPD was taken from Yokota *et al.* (1994).

Fig. 6. Separation by reverse-phase HPLC of tryptic peptides I and II from hDPD inactivated by [^{14}C]BVU in the presence of NADPH. Chromatograms were monitored by absorbance at 214 nm (solid lines) and by radioactivity measurement of an aliquot of the eluate collected every minute (histograms). HPLC columns were eluted with 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in water and an increasing amount of acetonitrile in a linear gradient manner (broken lines). Horizontal arrows above the radioactivity peaks (peptides) I and II represent the fractions pooled for further purification or as homogeneous samples. Homogeneity of the separated peptides I and II was confirmed by their *N*-terminal amino acid sequencing. Panel A represents separation on an Inertsil ODS-2 column of radioactive peptides I and II from a tryptic digest of hDPD (4 mg) inactivated by [^{14}C]BVU in the presence of NADPH. Panels B and C represent purification and partial purification of peptides I and II, respectively, on a Hi-Pore RP-304 column. Panel D represents rechromatography for purification of partially purified peptide II on the Inertsil ODS-2 column under the same conditions as used in panel A.

由来の hDPD に対する修飾残基の化学構造が明らかになった (Fig. 7). すなわち、反応性に富むジヒドロ-BVU の構造は 5,6-ジヒドロ-5-(2-ブロモエチリデンル)ウラシルであり、hDPD の基質結合部位中でこれが BVU から生成すると直ちに ^{671}Cys の SH と結合してスルフィドを形成する. NADPH 共存下で BVU による hDPD の不活性化反応は 10 mM チオール化合物 (システイン、2-メルカプトエタノール、またはジチオスレイトールなど) の添加によって全く抑制されなかった (Fig. 5). このことは、hDPD 分

子内の ^{671}Cys の SH とジヒドロ-BVU の反応が極めて速やかに起こることを物語っている.

トリプシン処理して得られた放射性ペプチド I の MALDI-TOF 質量スペクトル中には、 m/z 2556.40 に強度の大きいプロトン化分子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ シグナル (シグナル 1) と m/z 2574.42 に強度の小さい $[\text{M}+\text{H}]^+$ シグナル (シグナル 2) が観察された (Fig. 7A). シグナル 2 の質量数はシグナル 1 よりも 18 だけ大きく、シグナル 1 を与える分子が水和された分子が混在することを示していた. シグナル 1

Fig. 7. MALDI-TOF MS of radioactive peptide I from hDPD inactivated by ^{14}C BVU in the presence of NADPH. The peptide (A) was treated with NaOH (B) and TFA (C) under the conditions as shown in the figure.

Fig. 8. Proposed mechanism for the irreversible inactivation of hDPD, a rate-determining enzyme in the 5-FU catabolism, by BVU formed from SRV. Panels A–C represent the proposed mechanism for irreversible inactivation of hDPD by BVU in the presence of NADPH. ^{14}C BVU is reduced to reactive dihydro-BVU with NADPH at the pyrimidine-binding domain (^{665}Leu - ^{686}Gln) of hDPD, reacts instantly with the SH group of ^{671}Cys , and inactivates the enzyme. Various thiols (10 mM) had no effect on the inactivation of hDPD (see Fig. 5). Panels D–G represent the radioactive tryptic fragment I from the pyrimidine-binding domain of hDPD labeled with dihydro- ^{14}C BVU and the increase in mass number of the peptide by the treatments with NaOH and TFA (see Fig. 7).

Fig. 9. Proposed mechanism for the lethal interaction between FT and SRV. A part of dosed SRV is decomposed to BVU by gut flora in the intestines, absorbed through the intestinal membrane, and carried into the liver having potent activity of DPD. BVU is reduced to reactive dihydro-BVU by DPD, reacts with ⁶⁷¹Cys located at the substrate binding-domain of DPD and inactivates the enzyme. Inactivation of hepatic DPD leads rats and humans to poor 5-FU metabolizers and increases the tissue 5-FU levels markedly. Acute deaths in patients administered with SRV and FT, a 5-FU prodrug, are most likely to be attributable to severe toxicity to bone marrow by the markedly elevated level of 5-FU.

はペプチド I を室温で NaOH 処理すると大部分が速やかにシグナル 2 を与える水和分子に変換され (Fig. 7B), さらに水和分子をトリフルオロ酢酸 (TFA) と加熱すると, 水和分子に由来するシグナル 2 はゆっくりと減少し, さらに 18 だけ質量数が多い新たなシグナル 3 が出現した (Fig. 7C). ペプチド I のアルカリおよび酸処理によって, シグナル 1 は完全には消失しなかった. これはアルカリおよび酸に抵抗性の安定なピリミジン環をもつ付加体に基づくものと推定された (Fig. 8F).

⁶⁷¹Cys を含む hDPD のアミノ酸配列 (N-末端より 665~686 位) は各種動物のみならずショウジョウバエ, 線虫などでも完全に保存されており, ジヒドロ-BVU によって ⁶⁷¹Cys が修飾されたことから, この領域が hDPD のピリミジン結合領域であることが筆者らによりはじめて決定された. 筆者らによって明らかにされたソリブジン薬害の発生メカニズムを要約図示する (Fig. 9).

5. おわりに

ソリブジン薬害が発生した翌年の 1994 年から薬害発生メカニズム研究に取り組んできて, 1999 年に上記のような結果を得て, 筆者らのこの薬害研究に終止符を打つことができた. ソリブジンが, わが国で開発された新薬であり, 日本の毒性学者が責任をもってそのメカニズムを明らかにする必要があると考えたのが, この研究に着手した動機であった. ソリブジン薬害の研究では遺伝子工学と MALDI-TOF MS が決定的な役割を果たした.

なお, 過去にわが国で起こったサリドマイド, キノホル

ム, クロロキンなどの薬害においては, 因果関係のみが立証されただけで, 「なぜ」という毒性学的原因究明の研究成果は皆無に近い. 筆者らの研究成果が, 将来のわが国における薬害の毒性学的研究の嚆矢となることを期待する次第である.

ソリブジン薬害で亡くなられた患者は, ソリブジンの代謝物 BVU によって, 人為的に 5-FU の poor metabolizer (PM) にされてしまった. 最近の筆者らによる研究は, 日本人において, DPD 活性の人口分布が幅広く, 少なくとも人口の 0.5% は 5-FU の PM (DPD 活性が異常に低値) であることを示している. 遺伝的な 5-FU の PM が日本人に存在するのである. これら PM に対する 5-FU およびそのプロドラッグによる抗癌治療は, 患者を容易に死に至らせる可能性がある. しかも, わが国においては, 少なくとも 20 万人の人びとが術後の癌の再発予防のために 5-FU プロドラッグを日常的に服用しているという現実がある (欧米ではこの現実はない). 5-FU 製剤による抗癌治療に先立って, 遺伝的 DPD 欠損者の識別 (末梢血単核球中の DPD 活性の測定で可) がなされる必要があることを紙面を借りて警告しておく.

ラットにおける SRV と TF の併用のトキシコキネティクスを実施した奥田晴宏氏 (当時当研究室, 現国立医薬品食品衛生研究所) ならびに hDPD の基質結合部位の決定に成功した西山貴仁氏 (当研究室) に深く感謝する次第である.

文 献

- 1) 渡部 烈・奥田晴宏・小倉健一郎, 薬学雑誌, **117**, 910 (1997).
- 2) 渡部 烈, 総合臨牀, **48**, 1451 (1999).
- 3) 渡部 烈・西山貴仁・小倉健一郎, 薬物動態, **15**, 265 (2000).
- 4) H. Okuda, T. Nishiyama, K. Ogura, S. Nagayama, K. Ikeda, S. Yamaguchi, Y. Nakamura, Y. Kawaguchi, and T. Watabe, *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 270 (1997).
- 5) H. Okuda, K. Ogura, A. Kato, H. Takubo, and T. Watabe, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**, 791 (1998).
- 6) K. Ogura, T. Nishiyama, H. Takubo, A. Kato, H. Okuda, K. Arakawa, M. Fukushima, S. Nagayama, Y. Kawaguchi, and T. Watabe, *Cancer Lett.*, **122**, 107 (1998).
- 7) T. Nishiyama, K. Ogura, H. Okuda, K. Suda, A. Kato, and T. Watabe, *Mol. Pharmacol.*, **54**, 899 (2000).

Keywords: Dihydropyrimidine dehydrogenase, 5-FU pro-drug, MALDI-TOF MS, Lethal drug interaction, Sorivudine