ラット肝ミクロソームによるクロルフェニラミンの N-脱メチル化の
立体選択性: 年齢差, 性差に関する検討

野村明生, 櫻井栄一,* 引地 登

東北薬科大学, 〒981 仙台市青葉区小松島 4-4-1

**Stereoselective N-Demethylation of Chlorpheniramine in Rat
Liver Microsomes: Studies on Age and Sex Differences**

Akio NOMURA, Eiichi SAKURAI,* and Noboru HIKICHI

*Tohoku College of Pharmacy, 4-1 Komatsushima, 4-chome,
Aoba-ku, Sendai 981, Japan*

(Received March 13, 1995)

We have established a simple method for the chiral stationary-phase liquid chromatographic resolution of racemic chlorpheniramine (Chp) and its two N-demethylated metabolites, monodesmethylchlorpheniramine (DMChp) and didesmethylchlorpheniramine (DDMChp), using an ovomucoid-conjugated column with respective quantitation limits of 5 ng/ml. The assay was used to study the age and sex difference in stereoselective N-demethylation of Chp by rat liver microsomes. The formation rate of each DMChp from racemic Chp was about 2.2 times faster with the *S*-(+)-enantiomer than the *R*-(-)-enantiomer in male rats at the age of only 8 weeks, whereas the rate of N-demethylation in male rats was not different between *S*-(+)- and *R*-(-)-enantiomers at the age of 3 and 24 weeks. The $V_{\max}/K_m$ value for the formation of *S*-(+)-DMChp increased with age in male rats, but the value in 8-week-old rats was lower than that in 3-week-old rats in the formation of *R*-(-)-DMChp. In female rats, on the other hand, the formation rate of DMChp from racemic Chp did not differ between *S*-(+)- and *R*-(-)-enantiomers at each age, suggesting a lack of stereoselectivity in the microsomal N-demethylation. Moreover, the K_m and $V_{\max}$ values for N-demethylation of Chp enantiomers were nearly identical between two consecutive ages in female rats. Further metabolism of DMChp to DDMChp was not observed between both enantiomers in male and female liver microsomes at the age of 3, 8 and 24 weeks.

Key words—chlorpheniramine; N-demethylation; stereoselectivity; rat liver microsome; age difference; sex difference

緒 言

光学異性薬物の分離定量を前提とした薬物の体内動態の解析は、臨床における薬効評価の上で重要となる。H₁-受容体の拮抗薬であるマレイン酸クロルフェニラミン (Chp) は強力な抗ヒスタミン作用を有し、感冒薬や抗アレルギー薬として汎用されている。また、最近ではパーキンソン病や着座不能症の改善薬としても臨床に応用されている。^{1,2)} Chp はその構造内に不斉炭素有しており、*S*-(+)-Chp は *R*-(-)-Chp に比べて、*in vitro*^{3,4)} 及び *in vivo*⁴⁾ において 100—200 倍強い抗ヒスタミン作用を示す。さらに、脳内モノアミン代謝においても両エナンチオ

マー間に立体特異性のあることが認められている。^{5,6)} これらの研究は2つの異性体間の体内動態に違いがあることを推測させる。

前報において,⁷⁾ 我々は *R*-($-$)-Chp のラット血漿蛋白への結合が *S*-($+$)-体より強く、ラセミ体の急速静注後の各エナンチオマーの血漿中濃度の推移に違いがあることを認めた。しかし、この体内動態の違いは血漿蛋白への結合性の違いのほかに、肝における Chp の立体選択的代謝に起因することも十分に考えられる。Chp の主要代謝経路は N-脱メチル化であり、*in vivo* 及び *in vitro* 実験において、モノデスメチルクロールフェニラミン (DMChp) とジデスメチルクロールフェニラミン (DDMChp) の生成が確認されている。⁸⁻¹³⁾

本研究では *RS*-($\pm$)-Chp 及びその2つの N-脱メチル体 (*RS*-($\pm$)-DMChp と *RS*-($\pm$)-DDMChp) の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による一斉光学分割定量法を確立し、Chp の立体選択的 N-脱メチル化と年齢と性差との関係についてラット肝ミクロソームを用い検討した。

実 験 の 部

1. 実験動物 3, 8, 24 週齢の Wistar 系雄及び雌性ラット (日本エスエルシー) を用いた。日内変動を考慮して温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、照度サイクル 12 時間 (明期: 07:00—19:00) の環境にて、一定期間、固形飼料 (CE-2, 日本クレア) と水を自由に摂取させて飼育した。

2. 試薬 *RS*-($\pm$)-Chp は興和新薬、*S*-($+$)-Chp は吉富製薬、また *R*-($-$)-Chp, *RS*-($\pm$)-DMChp 及び *RS*-($\pm$)-DDMChp はアメリカ・シェリング社よりそれぞれ供与を受けた。グルコース-6-リン酸、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフォスフェート (NADP) はシグマ社から購入した。その他の試薬あるいは溶媒は市販特級品を使用した。

3. 肝ミクロソームの調製 ラットの断頭後、肝臓を速やかに摘出し、氷冷下、0.9% 塩化ナトリウム溶液で瀉血した。肝臓を4倍量の1.15% 塩化カリウム溶液でホモジナイズした後、 4°C 、 $9000 \times g$ で20分間遠心分離した。その上清を 4°C 、 $105000 \times g$ で60分間遠心分離し、赤褐色の沈渣を得た。この沈渣に1.15% 塩化カリウム溶液を加えて混濁させ、再び 4°C 、 $105000 \times g$ で60分間遠心分離し、沈渣としてミクロソーム画分を得た。ミクロソーム画分は0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、タンパク質濃度を20 mg/ml に調製した。タンパク質濃度は Bio-Rad タンパク定量キットにより測定した。¹⁴⁾

4. 酵素反応条件 反応時間の検討: 反応溶液は、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート (NADPH) 再生系 (0.2 mM NADP, 10 mM グルコース-6-リン酸, グルコース-6-リン酸脱水素酵素 1 unit/ml), 25 mM 塩化マグネシウム, ミクロソーム調製液 (0.5 ml), 及び基質として *RS*-($\pm$)-Chp 0.125 mM を含む全量が2 ml となるように調製した。上記反応系にミクロソーム調製液を添加することにより酵素反応を開始し、好氣的条件下で、 37°C 、10—120 分間インキュベートした。反応停止には0.4 M 過塩素酸溶液を添加した。

K_m , $V_{\max}$ 値の測定にあたっては、上記実験条件より反応時間を30分、基質の最終濃度を各エナンチオマー濃度にして12.5—750 μM の間に設定した。なお、非線形最小二乗法プログラム (MULTI)¹⁵⁾ を使って、ミハエリス-メンテン式にあてはめ K_m , $V_{\max}$ 値を求めた。

5. HPLC による DMChp と DDMChp の光学分割定量 0.4 M 過塩素酸溶液添加後、 $800 \times g$ で10分間遠心分離した。その上清を2 ml 分取し、塩化ナトリウム 1 g, 5 N 水酸化ナトリウム 1 ml, ベンゼン 7 ml を加えて10分間振とうし、 $800 \times g$ で10分間遠心分離を行い、有機溶

媒層を 5 ml 分取した。得られた有機溶媒層を減圧乾固し、残渣に 20 mM リン酸緩衝液 (pH 5.6)-アセトニトリル (40:3, v/v) 溶液 0.1—6.0 ml に溶解して HPLC 分析試料とした。

HPLC 装置及び測定条件は次の通りである。ポンプは L-5000 (柳本製作所) を用い、UV-8 model II 型紫外検出器 (東ソー, 測定波長: 228 nm) に接続した。カラムはオボムコイド結合の光学活性カラム Ultron ES-OVM (信和化工, 4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm) を用い、移動相として 20 mM リン酸緩衝液 (pH 5.6)-アセトニトリル (40:3, v/v) を流速 1.0 ml/min, カラム温度 30 ± 1°C に設定し、上記試料 20 μl を注入した。クロマトグラム上のピークは、データ解析処理装置 (日立製作所, D-2500) により得られた面積より算出し、定量した。

R-(-)-体及び S-(+)-体の Chp, DMChp, DDMChp の標準サンプルの保持時間はそれぞれ 9.9, 13.6, 15.5, 16.4, 22.6, 21.4 分であった。

6. 統計処理 結果における各エナンチオマー間の統計学的有意差は Student's *t*-test により行い、 $p < 0.05$ を有意として示した。

結 果

1. RS-(±)-Chp 及びその N-脱メチル体の光学分割

雄性、8 週齢のラット肝ミクロソームに RS-(±)-Chp を 750 μM 添加し、30 分間インキュベートした後のベンゼン抽出物のクロマトグラムを Fig. 1 に示した。30 分間の酵素反応後の Chp 及び DMChp の各エナンチオマーは夾雑物の影響なしに完全に光学分割された。Chp,

Fig. 1. Chiral Stationary-Phase Liquid Chromatograms of Extracted Samples of Liver Microsomes of 8 Weeks Old Male Rats at 30 min after Incubation at 37°C Following Addition of Racemic Chp

A: blank microsomes, B: before incubation, C: after incubation.

DMChp 及び DDMChp の各エナンチオマーの検量線は 0.99 ($n=8$) 以上の相関係数で 0.005—10 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で直線性を示し、検出限界は 5 ng/ml であった。また、変動計数は 3.5% 以下と再現性は良好であった。なお、DDMChp に関しては前述したように、標準サンプルにおいては完全に光学分離されている。しかし、詳細については後で述べるが、我々の反応条件下においては性差・年齢に関係なく DDMChp の生成は S -(+)- 及び R -(−)- 体双方からはともに観察されなかった。

2. 酵素反応時間の設定

Fig. 2 に、8 週齢、雄性ラットの肝ミクロソームに RS -(±)-Chp を 0.125 mM 添加し、0—40 分間インキュベートした後の各時間における S -(+)- 及び R -(−)-DMChp の生成量を示した。いずれの時間においても、 S -(+)-DMChp の生成は R -(−)- 体のそれよりも高い値をとった。また、どちらの反応も 0 と 40 分の間が直線性となったことから、酵素反応時間は 30 分に設定した。

3. ラット肝ミクロソームによる RS -(±)-Chp の N -脱メチル化に及ぼす年齢・性差の影響

1) 雄ラット肝ミクロソームによる検討 3, 8, 24 の各週齢の雄ラット肝ミクロソームによる Chp の N -脱メチル化反応における基質濃度-酵素活性曲線を Fig. 3 に示した。3 週齢未成熟ラットの肝ミクロソームを用いた場合、 S -(+)- と R -(−)- の DMChp の生成量に有意な差はなかったが、 R -(−)-DMChp の生成が S -(+)- 体の生成よりも高い値がみられた (Fig. 3A)。8 週齢成熟ラットの肝ミクロソームを用いた場合には、Chp のいずれの濃度においても S -(+)-DMChp の生成速度が R -(−)-DMChp の生成速度よりも有意に大きく、Chp の N -脱メチル化に立体選択性が観察された (Fig. 3B)。しかし、24 週齢老齢ラットの肝ミクロソームの場合には、8 週齢ラットの肝ミクロソームを用いた時と同様に S -(+)-DMChp の生成が R -(−)- 体の生成よりは高かったものの、有意な差は認められなかった (Fig. 3C)。また、これらの結果より得られた Chp の N -脱メチル化に対する各エナンチオマーの K_m 及び $V_{\max}$ 値を算出し、Table 1 に示した。その結果、8 週齢雄性ラットの肝ミクロソームを用いた場合、 S -(+)-Chp と R -(−)-Chp の N -脱メチル化に対する K_m 値に有意な差は見られなかったが、 S -(+)-Chp に対する $V_{\max}$ 値は R -(+)-Chp に比較して約 2.2 倍高い値をとった。さらに、 $V_{\max}/K_m$ 値を求めたところ、 S -(+)- 体のみ加齢に伴い上昇した。しかしながら、8 週齢を除いて、3 及び 24 週齢においては各エナンチオマー間でその値に有意な差は認められなかった。

2) 雌ラット肝ミクロソームによる検討 3, 8, 24 の各週齢の雌ラット肝ミクロソームによる Chp の N -脱メチル化反応における基質濃度-酵素活性曲線を Fig. 4 に示した。いずれの週齢の雌ラット肝ミクロソームを用いても、 S -(+)-DMChp と R -(−)-DMChp の生成量に差は認められなかった。また、Chp の各エナンチオマーの N -脱メチル化に対する K_m 及び $V_{\max}$ 値は各週齢間で有意な差はなく、加齢による $V_{\max}/K_m$ 値の上昇は観察されなかった (Table 1)。

Fig. 2. Rate of Formation of Each DMChp Enantiomer from Racemic Chp by Male Rats (8 Weeks) Liver Microsomes

Incubations of microsomes with 125 μM of racemic Chp were conducted for 0 to 40 min at 37°C. Each value is the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments. $\circ$, S -(+)-DMChp; $\bullet$, R -(−)-DMChp.

Fig. 3. Michaelis-Menten Plots in the Formation of Each DMChp Enantiomer from Racemic Chp Incubated with Male Rats Liver Microsomes at the Age of 3 (A), 8 (B) and 24 (C) Weeks

The axis of abscissas was expressed as the concentration of each Chp enantiomer. Each value is the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments. $\circ$, S-(+)-DMChp; $\bullet$, R-(-)-DMChp. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Fig. 4. Michaelis-Menten Plots in the Formation of Each DMChp Enantiomer from Racemic Chp Incubated with Female Rats Liver Microsomes at the Age of 3 (A), 8 (B) and 24 (C) Weeks

The axis of abscissas was expressed as the concentration of each Chp enantiomer. Each value is the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments. $\circ$, S-(+)-DMChp; $\bullet$, R-(-)-DMChp.

Table 1. Kinetic Parameters of N-Demethylation of Racemic Chp in Male and Female Rats Liver Microsomes at the Age of 3, 8, and 24 Weeks

	3 weeks		8 weeks		24 weeks	
	S-(+)-Chp	R-(-)-Chp	S-(+)-Chp	R-(-)-Chp	S-(+)-Chp	R-(-)-Chp
Male						
K_m (mM)	0.27±0.15	0.22±0.03	0.18±0.07	0.16±0.07	0.07±0.02	0.06±0.02
V_{max} (nmol/mg protein/min)	0.20±0.11	0.23±0.06	0.29±0.04*	0.13±0.03	0.22±0.05	0.17±0.05
V_{max}/K_m (ml/mg protein/min)	0.81±0.13	1.04±0.21	1.73±0.28*	0.87±0.12	3.18±0.12	2.86±0.07
Female						
K_m (mM)	0.20±0.09	0.18±0.09	0.18±0.04	0.13±0.07	0.19±0.02	0.20±0.02
V_{max} (nmol/mg protein/min)	0.13±0.07	0.10±0.05	0.16±0.06	0.14±0.03	0.16±0.06	0.14±0.06
V_{max}/K_m (ml/mg protein/min)	0.60±0.05	0.56±0.10	0.87±0.08	0.96±0.11	0.83±0.13	0.68±0.13

Each value is the mean±S.E. of 5 experiments. * $p < 0.05$, significantly different between enantiomers.

考 察

Chp は肝で N-脱メチル化され DMChp となり、さらに N-脱メチル化を受け DDMChp となる。N-脱メチル化の活性は *in vitro* 実験系においては、生成されるホルムアルデヒドを測定することにより求められる。しかし、その値には Chp からの DMChp と DDMChp の両 N-脱メチル化活性を含むことになる。また、現在までにガスクロマトグラフィー⁸⁾や HPLC による^{13,16)} Chp とその N-脱メチル化体の分離定量は確立されているが、HPLC による Chp 及びその代謝物の光学分割による同時分離定量化は確立されていない。本研究では、我々の前報⁷⁾で得られた HPLC による Chp の光学分割法を改良することにより、Chp, DMChp 及び DDMChp の各ラセミ体を生体成分などの夾雑物の影響なしに、同時に一斉光学分割することができた。この方法は簡便かつ検出限界が 5 ng/ml と良好なことから、ラット肝ミクロソームによる Chp の N-脱メチル化の立体選択性の検討に十分応用が可能であろうと考えられた。

ラットの肝ミクロソームにおける薬物代謝酵素活性はラットの成長と共に変化する。¹⁷⁾ また、雌雄ラットから雌及び雄固有のチトクローム P450 (CYP) が精製されている。¹⁸⁾ 成長により雄ラットでは雌固有の CYP2C12 が生後 25 日くらいに軽度が発現されるが、30 日以降はその発現は抑制され、雄固有の CYP2C11 が増加してくる。これに対して、雌ラットでは生後 30 日くらいから CYP2C12 が発現するが、CYP2C11 の発現はないと報告されている。¹⁹⁾ さらに、薬物酸化酵素の雌雄ラットにおける生後発達は薬物により異なることも知られている。²⁰⁾ そこで、本研究ではラット肝ミクロソームによる Chp の N-脱メチル化の立体選択性と年齢差あるいは性差との関連性についても検討を加えた。

8 週齢、雄性ラットの肝ミクロソームを用いた場合、いずれの濃度においても S-(+)-Chp に対する N-脱メチル化が R-(-)-Chp の N-脱メチル化に比べて大きく、顕著な立体選択性が観察された。このことは Thompson と Shiohita¹⁰⁾の重水素標識（どちらかのエナンチオマーに対してラベル化を行う：例えば S-(+)-Chp- d_4 と R-(-)-Chp の等量混合物を使用）とガスクロマトグラフ-マススペクトルとを組み合わせた方法により得られた結果と一致した。また、雄性ラット肝ミクロソームによる Chp から DMChp への生成に対する V_{max}/K_m 値は、S-(+)-体では

加齢に伴い上昇したが、*R*-(*-*)-体では8週齢<3週齢<24週齢の順であった。さらに、有意な差はないものの、3週齢の幼弱・雄ラット肝ミクロソームの $V_{\max}/K_m$ 値における立体選択性 ($R>S$) は、8週齢で得られたもの ($R<S$) と逆転していた。また、24週齢では8週齢で観察されたキラル識別が再び見られなくなった。

一方、雌のラット肝ミクロソームを用いた場合には、DMChp の生成はいずれの年齢においてもエナンチオマー間で有意な差は認められなかった。さらに、N-脱メチル化に対する $V_{\max}/K_m$ 値は各年齢間、各エナンチオマー間で有意な差はなく、Chp の N-脱メチル化に立体選択性は観察されなかった。

肝ミクロソームを用いた *in vitro* 実験系において、DDMChp の生成は動物種あるいは系統間で違いが見られる。¹⁰⁾ ラットあるいはマウスにおいては DDMChp の生成は認められないが、New Zealand White 雄性家兎では DDMChp の生成が認められ、しかもその生成に立体選択性が観察されている。¹⁰⁾ 本実験系の反応条件下では、雌・雄ラット肝ミクロソームによる DMChp から DDMChp への N-脱メチル化は、いずれの週齢、いずれのエナンチオマー間においても認められなかった。

以上、ラット肝ミクロソームにおける Chp の N-脱メチル化及びその立体選択性は年齢や性の違いで様相がかなり異なっており、Chp の *in vivo* 実験における体内動態の差異^{7,21,22)} の原因になることが示唆される。現在、ラットにおける Chp の DMChp 化代謝に関与する CYP 分子種の同定とそのキラル識別について検討中である。

引用文献

- 1) Giar D. C., Ducey J., *Arch. Intern. Med.*, **85**, 284 (1950).
- 2) Sato M., Saito H., Matsumoto H., Matsuoka H., Matsumoto J., Ueno T., Fuse Y., Matsue Y., Kodama M., Maeyama K., *Annu. Rep. Pharmacopsychi. Res. Foun.*, **21**, 302 (1989).
- 3) Roth F. E., Govier W. M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **124**, 347 (1958).
- 4) Hill S. J., Emson P. C., Young J. M., *J. Neurochem.*, **31**, 997 (1978).
- 5) Sakurai E., Yamasaki S., Hikichi N., Onodera K., *Tohoku J. Exp. Med.*, **163**, 239 (1991).
- 6) Sakurai E., Yamasaki S., Hikichi N., Onodera K., *Jpn. J. Psychopharmacology*, **11**, 237 (1991).
- 7) Sakurai E., Yamasaki S., Iizuka Y., Hikichi N., Niwa H., *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 44 (1992).
- 8) Kamm J. J., Ferullo C. R., Miller D., van Loon E. J., *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 659 (1969).
- 9) Peets E. A., Jackson M., Symchowicz S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **180**, 464 (1972).
- 10) Thompson J. A., Shiohita G. W., *Drug Metab. Dispos.*, **9**, 5 (1981).
- 11) Huang S. M., Huang Y. C., Chiou W. L., *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **9**, 725 (1981).
- 12) Huang S. M., Athanikar N. K., Sridhar K., Huang Y. C., Chiou W. L., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **22**, 359 (1982).
- 13) Zbaida S., Touitou E., *J. Pharm. Sci.*, **77**, 188 (1988).
- 14) Bradford M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
- 15) Yamaoka K., Tanigawara Y., Nakagawa T., Uno T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **4**, 879 (1981).
- 16) Athanikar N. K., Peng G. W., Nation R. L., Huang S. M., Chiou W. L., *J. Chromatogr.*, **162**, 367 (1979).

-
- 17) Kato R., Chiesara E., Vassanelli P., *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 69 (1964).
 - 18) Kamataki T., Maeda K., Yamazoe Y., Nagai T., Kato R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **225**, 758 (1983).
 - 19) Maeda K., Kamataki T., Nagai T., Kato R., *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 509 (1984).
 - 20) Yamazoe Y., Murayama N., Shimada M., Yamauchi K., Nagata K., Imaoka S., Funae Y., Kato R., *J. Biochem.*, **104**, 785 (1988).
 - 21) Miyazaki H., Abuki H., *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 2572 (1976).
 - 22) Fujiwara K., Iwamoto K., Kawai S., Sakamoto T., *Yakugaku Zasshi*, **109**, 59 (1989).