

新規ノイラミニダーゼ阻害薬ラニナミビルの  
プロドラッグ化による気道貯留性の向上と  
そのメカニズム解析

2013

小山 久美子

A prodrug approach toward an improved airway drug  
targeting of a novel neuraminidase inhibitor laninamivir, with  
a mechanism analysis of its prolonged high retention

Kumiko Koyama

## **A prodrug approach toward an improved airway drug targeting of a novel neuraminidase inhibitor laninamivir, with a mechanism analysis of its prolonged high retention**

Kumiko Koyama

Laninamivir octanoate (LO) is an octanoyl ester prodrug of the neuraminidase inhibitor laninamivir and demonstrates a prolonged antiviral effect in comparison with other antiviral agents, oseltamivir and zanamivir. In mice infected with influenza virus (A/Puerto Rico/8/34), a single intranasal dose of LO shows an antiviral effect that is similar/superior to those after repeated intranasal dose of zanamivir and repeated oral dose of oseltamivir. Moreover, a single inhaled dose of LO exhibits therapeutic efficacy in treating both adult and pediatric patients with influenza virus infection. In the present study, both *in vivo* and *in vitro* tests were performed using mice and rats in order to investigate the factor/mechanism involved in such a prolonged effect, from the viewpoints of pharmacokinetics and disposition. The findings from this study are summarized as follows:

1) After a single intranasal administration of LO (0.5  $\mu\text{mol/kg}$ ) in mice, LO was efficiently converted to its active form laninamivir by hydrolases such as carboxylesterase and cholinesterase which were considered to be present in the airway tissues, and thereafter the generated laninamivir was retained over long periods in both the trachea and the lungs. At 24 h post-dose, this retention level was approximately 10-fold higher than those after intranasal administration of laninamivir itself and zanamivir (0.5  $\mu\text{mol/kg}$ ), being much higher than  $\text{IC}_{50}$  values *in vitro*. These results demonstrated that such a favorable property could be achieved by utilizing a prodrug approach and that LO had potential as a long-acting neuraminidase inhibitor, leading to its significant efficacy as an anti-influenza drug by a single treatment.

2) In the same fashion, after a single intratracheal administration of LO in rats, the generated laninamivir was retained over long periods in the airway tissues. Plasma  $t_{1/2}$  of laninamivir (14.1 h) was quite long compared with that after intravenous administration of laninamivir (0.5 h), indicating that the long plasma  $t_{1/2}$  may be attributed to the slow release of laninamivir into the systemic circulation from the airway tissues – absorption rate-limited elimination ('flip-flop' kinetics). Furthermore, the laninamivir absorbed gradually into the systemic circulation was mainly excreted into the urine via glomerular filtration, without any further metabolism. From these findings, it is possible to predict the drug retention level in human airway tissues through the determination of plasma pharmacokinetics and/or urinary excretion, though actual drug concentrations in the target tissues cannot be determined.

3) After a single intranasal administration of LO in mice, the generated laninamivir present in the airway tissues was localized mainly on the epithelial cells. In primary cultured mouse airway epithelial cells, uptake of LO increased with the concentration without any apparent saturation even at the highest concentration tested (1000  $\mu\text{M}$ ), suggesting that the involvement of transporters in the cellular uptake is unlikely. Additionally, no saturation was observed in the cellular hydrolysis over the LO concentration range tested, indicating that the hydrolase(s) involved in the LO hydrolysis has a high catalytic capacity. Furthermore, the intracellular laninamivir was released very slowly into the extracellular compartment with an estimate rate constant of  $0.0707 \text{ h}^{-1}$ , which was regarded as a rate-limiting step in the cellular retention.

4) From both *in vivo* and *in vitro* study results, pharmacokinetic mechanism involved in such a preferable retention can be explained by a consecutive series of the following three steps: 1) transport of LO from the airway space into airway epithelial cells by passive diffusion, 2) conversion/hydrolysis of LO into laninamivir by esterase(s) localized in the cells, 3) trapping of the generated laninamivir within the cells due to its poor membrane permeability, resulting in a slow release of the laninamivir into the extracellular compartment.

The present study revealed the pharmacokinetic factors involved in the prolonged antiviral effect, along with a part of the high drug retention mechanism(s), after intranasal/intratracheal administration of the prodrug LO in mice and rats. In most cases, prodrug strategies are applicable to orally administered drugs and therefore researches of drug metabolism including hydrolysis are focused especially on the intestine and liver, with lesser reports on the airway tissues such as the lungs. The LO used in this study would become an example for the development of inhaled prodrugs by utilizing hydrolase(s) in the airway tissues, with the aim of prolonged high retention of its active form in the airway tissues toward a longer-lasting antiviral effect. This could be one of the rational prodrug approaches for lung-targeting drug delivery and is expected to be applicable for other pulmonary acting drugs.

# 新規ノイラミニダーゼ阻害薬ラニナミビルのプロドラッグ化による 気道貯留性の向上とそのメカニズム解析

小山 久美子

ラニナミビルオクタン酸エステル (laninamivir octanoate, LO) は、ノイラミニダーゼ阻害活性を有する laninamivir にオクタン酸エステルを付加した吸入型プロドラッグであり、類薬の oseltamivir や zanamivir に比べて抗ウイルス作用が持続するという特長を有する。すなわち、インフルエンザウイルスのマウス感染モデルにおいて、oseltamivir や zanamivir が反復経口/反復経鼻投与により抗ウイルス作用を示すのに対し、LO は単回経鼻投与で十分な抗ウイルス作用を示す。さらにインフルエンザウイルスの感染患者においても、1 回の吸入投与により治療効果を発揮する。そこで本研究では、このような作用の持続をもたらす要因やメカニズムを薬物動態の観点から明らかにすることを目的に、マウスあるいはラットを用いて *in vivo* および *in vitro* で検討を実施した。以下に本研究で得られた知見を要約する。

1) マウスに LO を単回経鼻投与後、LO は気道組織に存在する加水分解酵素 (カルボキシルエステラーゼやコリンエステラーゼと推定) により laninamivir へと効率良く変換された。この laninamivir は気道組織に長時間貯留し、投与後 24 h における気管中および肺中 laninamivir 濃度は、laninamivir 自身の単回経鼻投与に比べて 10 倍程度高かったことから、プロドラッグ化により望ましい貯留特性を獲得していることが明らかとなった。さらに、この貯留性は zanamivir の単回経鼻投与よりも高く、なおかつ laninamivir の IC<sub>50</sub> 値よりも充分高い濃度を維持していたことから、この高い気道貯留性が LO 投与による抗ウイルス作用の持続に寄与していると考えられた。

2) ラットの LO 単回経気管投与でも、マウスの場合と同様に、活性体 laninamivir が気道組織に長時間貯留した。血漿中における laninamivir の t<sub>1/2</sub> (14.1 h) は、laninamivir 単回静脈内投与時の t<sub>1/2</sub> (0.5 h) に比べて非常に長く、この差異は気道組織に存在する laninamivir が循環血中へと吸収される過程が律速 (flip-flop 現象) となることにより生じているものと考えられた。さらに、循環血へと徐々に吸収された laninamivir は、さらなる代謝を受けることなく主として尿中へと排泄され、その排泄は糸球体濾過によると考えられた。これより、気道組織における薬物濃度評価が困難なヒトにおいても、血漿中の薬物動態あるいは尿中への薬物排泄挙動を評価することにより間接的に laninamivir の気道貯留性を推測できると考えられた。

3) マウスの LO 単回経鼻投与後において、気道組織に存在する laninamivir は主として気道上皮細胞に局在していた。初代培養したマウス気道上皮細胞において、LO の細胞内取り込みに濃度飽和性が認められなかったことから、取り込み過程は主に受動輸送であり、トランスポーターの関与は無いと考えられた。また、細胞内に取り込まれた LO は加水分解を受けて laninamivir に変換し、この過程にも飽和性が認められなかったことから、関与する加水分解酵素は高い触媒能を有していると考えられた。さらに、細胞内からの laninamivir 放出速度定数 ( $0.0707 \text{ h}^{-1}$ ) は、細胞内における LO 加水分解速度定数 ( $0.561 \text{ h}^{-1}$ ) や細胞内からの LO 放出速度定数 ( $0.950 \text{ h}^{-1}$ ) に比べて非常に小さいことから、この放出過程が細胞内での laninamivir 貯留の律速であると推察された。

4) これら *in vivo* および *in vitro* における検討結果より、LO の気道貯留メカニズムは以下に示す 3 つのステップから成り立っていると考えられた。①経鼻投与あるいは経気管投与後において、LO が気道空間から気道上皮細胞内へと受動輸送により取り込まれる。②気道上皮細胞内に存在する加水分解酵素により LO が加水分解を受け、活性体 laninamivir が生成する。③生成した laninamivir は、高い水溶性のために細胞膜の透過性が低く、その結果として laninamivir が細胞内に高い濃度で長時間維持される。

以上のように、本研究では LO 投与によって抗ウイルス作用が持続する要因を薬物動態の観点から明らかにするとともに、そのメカニズムの一端も明らかにした。現在上市されているプロドラッグは経口剤が多く、このため加水分解をはじめとする代謝研究は小腸や肝臓が中心であり、肺などの気道組織における代謝研究の報告はごく僅かである。本研究で用いた LO は、気道組織に存在する加水分解酵素を利用した吸入型プロドラッグの一例となるものであり、しかも気道組織における高い貯留性を指向したものであることから、気道組織における効果の持続性を向上させるという点においてプロドラッグの新たな可能性を示すものである。このようなアプローチは、インフルエンザ治療薬のみならず、喘息、慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症などの呼吸器疾患領域の治療薬を開発する上においても、標的器官での薬物貯留性を向上させる 1 つの手段となることが期待される。

本論文で使用した略号一覧表

AEBSF	4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルフォニルフルオリド
AUC	血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC <sub>0-inf</sub>	無限大時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC <sub>last</sub>	定量可能な最終時点までの血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC <sub>0-t</sub>	投与 <i>t</i> 時間後までの血漿中濃度-時間曲線下面積
BAL	気管支肺胞洗浄
BNPP	ビス(4-ニトロフェニル)リン酸ナトリウム
CL	全身クリアランス
C <sub>max</sub>	最高血漿中濃度
DFP	ジイソプロピルフルオロリン酸
DTNB	5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
ELF	肺上皮粘液
F	生物学的利用率
HA	ヘマグルチニン
IC <sub>50</sub>	50%阻害濃度
IS	内部標準物質
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計
LSC	液体シンチレーションカウンター
LO	ラニナミビルオクタン酸エステル
NA	ノイラミニダーゼ
NP	核タンパク質
PCMB	<i>p</i> -クロル安息香酸第二水銀
Radio-HPLC	放射能検出高速液体クロマトグラフィー
S9	9000g 上清
t <sub>1/2</sub>	終末相の消失半減期
TLC	薄層クロマトグラフィー
t <sub>max</sub>	最高血漿中濃度到達時間
V <sub>ss</sub>	定常状態下の分布容積

本論文は、以下の原著論文に基づくものである。

- 1) CS-8958, a prodrug of the novel neuraminidase inhibitor R-125489, demonstrates a favorable long-retention profile in the mouse respiratory tract.  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 4845–4851 (2009).  
Koyama K., Takahashi M., Oitate M., Nakai N., Takakusa H., Miura S., Okazaki O.
  
- 2) Pharmacokinetics and disposition of CS-8958, a long-acting prodrug of the novel neuraminidase inhibitor laninamivir in rats.  
*Xenobiotica*, **40**, 207–216 (2010).  
Koyama K., Takahashi M., Nakai N., Takakusa H., Murai T., Hoshi M., Yamamura N., Kobayashi N., Okazaki O.
  
- 3) Pharmacokinetic mechanism involved in the prolonged high retention of laninamivir in mouse respiratory tissues after intranasal administration of its prodrug laninamivir octanoate.  
*Drug Metab. Dispos.*, **41**, 180–187 (2013).  
Koyama K., Nakai D., Takahashi M., Nakai N., Kobayashi N., Imai T., Izumi T.

## 目次

第 1 章	緒言 .....	1
第 2 章	マウスに LO を単回経鼻投与後の気道貯留性 .....	7
2.1	序論 .....	7
2.2	全身オートラジオグラフィー .....	7
2.3	気管および肺中放射能濃度の定量 .....	8
2.4	気管および肺中代謝物の同定 .....	9
2.5	肺中薬物濃度推移 .....	11
2.6	気管および肺 S9 における LO の加水分解 .....	12
2.7	小括 .....	13
第 3 章	ラットにおける気道貯留性に起因した血中動態と排泄挙動 .....	14
3.1	序論 .....	14
3.2	組織中放射能濃度推移 .....	14
3.3	気管中および肺中代謝物の同定 .....	15
3.4	血漿中薬物濃度推移 .....	16
3.5	尿糞中および胆汁中排泄 .....	20
3.6	肺中薬物量と尿中排泄薬物量との関連性 .....	21
3.7	小括 .....	22
第 4 章	マウスを用いた気道貯留メカニズムの解明 .....	23
4.1	序論 .....	23
4.2	ELF 中、肺組織中、および血漿中薬物濃度推移 .....	23
4.3	マイクロオートラジオグラフィー .....	27
4.4	初代培養気道上皮細胞への薬物取り込み .....	28
4.5	初代培養気道上皮細胞からの薬物放出 .....	29
4.6	気道貯留メカニズム .....	31
4.7	小括 .....	32
第 5 章	気道貯留性を指向した吸入剤のプロドラッグ化に関する考察 .....	33
第 6 章	総括 .....	37
実験の部	.....	40
謝辞	.....	55
参考文献	.....	56

## 第1章 緒言

インフルエンザウイルス感染症は、インフルエンザウイルスによって引き起こされる急性呼吸器感染症であり、患者の咳嗽やくしゃみにより発生する飛沫の直接吸入（飛沫感染）や閉鎖空間で浮遊するインフルエンザウイルスを含む飛沫核の吸入（空気感染）によって伝播すると考えられている。インフルエンザウイルスに感染すると、1～4日の潜伏期間を経た後、高熱、悪寒、頭痛、倦怠感、疲労感、筋肉痛などの全身症状に加え、乾性咳嗽、咽頭痛、鼻炎などの呼吸器症状を呈する。発症した患者の多くは軽症のまま1週間程度で回復するが、免疫能が低下している乳幼児、高齢者、妊婦、免疫不全患者、あるいは基礎疾患（糖尿病などの代謝性疾患、腎機能障害、慢性呼吸器疾患、慢性心疾患）を有する患者では、細菌による二次感染や原疾患の悪化を伴うリスクがあり、場合によっては死に至るケースもある<sup>1),2)</sup>。

インフルエンザウイルスは、タンパク質とリン脂質からなる膜（エンベロープ）を有し、遺伝子としてRNAを有する粒子径80～120 nmのウイルスである<sup>3),4)</sup>。ウイルス粒子を構成するタンパク質のうち、核タンパク質（NP）とマトリックスタンパク質（M1）の抗原性の違いによりA型、B型、C型の3つに分類される。更にA型においては、エンベロープ表面上の分子であるヘマグルチニン（HA）とノイラミニダーゼ（NA）の抗原性の違いにより複数の亜型に分類されており（Fig. 1.1）、これまでに16種類のHA亜型（H1～H16）と9種類のNA亜型（N1～N9）が報告されている<sup>5),6)</sup>。季節性インフルエンザウイルス感染症の原因となるヒトインフルエンザウイルスは、主としてA型2種（H1N1亜型、H3N2亜型）およびB型であり、なかでもA型についてはHA等の抗原性が少しずつ変化することにより（連続変異）、過去の感染歴やワクチン接種によって獲得された免疫を回避しながらシーズン毎に流行を繰り返す。一方、新しい亜型ウイルスの出現に代表されるように、過去に流行したウイルスと抗原性が大きく異なる場合（不連続変異）には新型インフルエンザウイルスと見なされ、ほとんどのヒトがこのウイルスに対する免疫を欠くために世界的な大流行（パンデミック）を引き起こすことがある<sup>7)</sup>。最近では、2009年に発生したブタ由来H1N1亜型による新型インフルエンザウイルスの事例があり<sup>8)</sup>、WHOは同年6月にこの新型インフルエンザウイルスに対する警戒水準をフェーズ6に引き上げてパンデミックを宣言した<sup>9)</sup>（但し、現在では通常の季節性インフルエンザウイルスとして取り扱われている<sup>10)</sup>）。また、鳥からヒトへの感染が確認されている高病原性H5N1型トリインフルエンザウイルスが突然変異して、ヒトからヒトに感染する新型インフルエンザウイルスが発生する脅威も依然として大きい<sup>11),12)</sup>。このような状況から、日本では、新型インフルエンザウイルスへの対策が国家の危機管理に関わる重要な課題と位置付けられており<sup>13)</sup>、「新型インフルエンザ対策行動計

画」の策定などを通じて新型インフルエンザウイルスの発生・流行に備えた医療や社会機能維持などの対策強化が図られている。

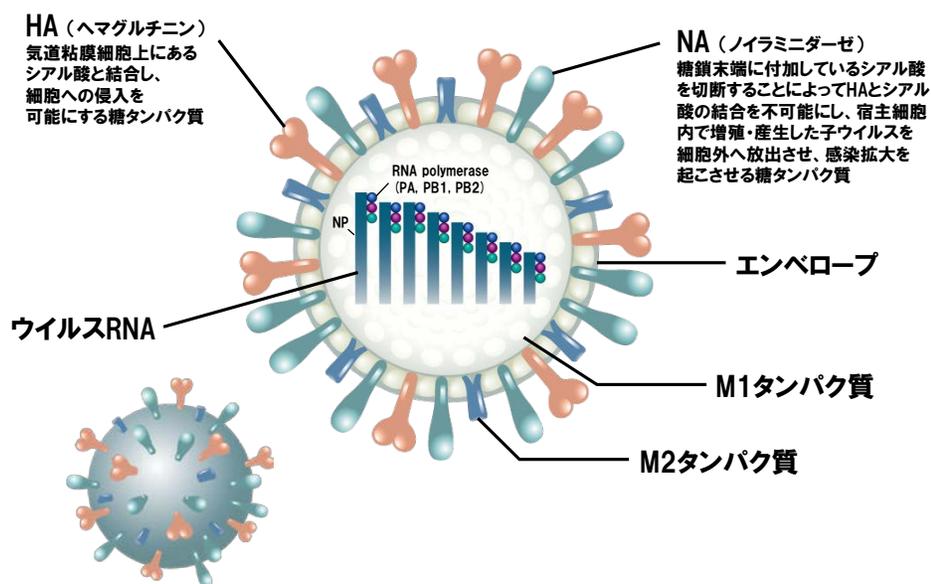
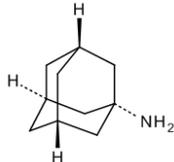
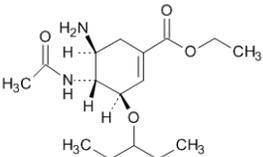
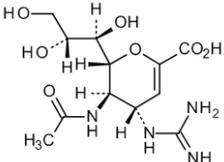
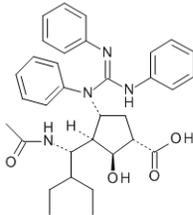
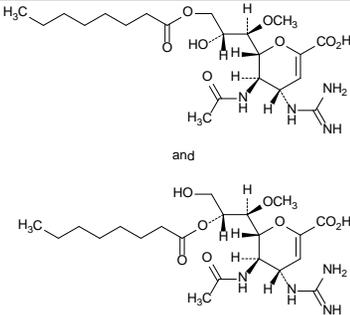


Fig. 1.1 A型インフルエンザウイルスの構造<sup>14),15)</sup>

現在、インフルエンザウイルス感染症に対する医療は、ワクチンによる予防と抗インフルエンザウイルス薬による治療の2つに大別される。予防に用いるワクチンは、翌シーズンに流行するウイルス株の予測に基づいて毎年製造される。接種により中和抗体を誘導することで、体内でのウイルス増殖を抑制し症状を軽減させるが、抗原性が一致しない場合には有効性が期待できない<sup>16)</sup>。さらに新型インフルエンザウイルスの場合には、発生直後のワクチン供給が困難であることから、抗インフルエンザウイルス薬の投与が治療だけでなく予防においても重要な手段となる<sup>17)</sup>。抗インフルエンザウイルス薬としては、日本では、M2チャンネル阻害薬のアマンタジン塩酸塩（シンメトレル<sup>®</sup>、経口剤）、NA阻害薬のオセルタミビルリン酸塩（タミフル<sup>®</sup>、経口剤）、ザナミビル水和物（リレンザ<sup>®</sup>、吸入剤）、ペラミビル水和物（ラピアクタ<sup>®</sup>、注射剤）、ラニナミビルオクタン酸エステル水和物（イナビル<sup>®</sup>、吸入剤）の計5成分が認可されている（Table 1.1）。M2チャンネル阻害薬のアマンタジンは、パーキンソン病治療薬<sup>18), 19)</sup>や精神活動改善薬（脳梗塞後遺症に伴う意欲・自発性低下の改善薬）<sup>20)</sup>として古くから用いられている薬剤であるが、これに加えてA型インフルエンザウイルスのエンベロープ上に存在するイオンチャンネルであるM2タ

Table 1.1 日本で上市されている抗インフルエンザウイルス感染症治療薬

薬効分類	M2 チャネル 阻害薬	ノイラミニダーゼ (NA) 阻害薬			
一般名 (製品名)	アマンタジン <sup>21)</sup> (シンメトレル <sup>®</sup> )	オセルタミビル <sup>22), 23)</sup> (タミフル <sup>®</sup> )	ザナミビル <sup>24)</sup> (リレンザ <sup>®</sup> )	ペラミビル <sup>25)</sup> (ラピアクタ <sup>®</sup> )	ラニナミビルオクタン酸 エステル <sup>26)</sup> (イナビル <sup>®</sup> )
化学構造					
剤形	経口剤	経口剤 【カプセル】成人、小児*1 【ドライシロップ】1歳以上	吸入剤	注射剤	吸入剤
1日投与量 成人	1日 100 mg を 1～ 2 回に分割投与	【カプセル】 75 mg x 1 日 2 回	10 mg x 1 日 2 回	300 mg を 15 分以上か けて単回点滴静注*3	40 mg、単回
小児	—	【ドライシロップ】 2 mg/kg x 1 日 2 回	10 mg x 1 日 2 回*2	10 mg/kg を 15 分以上 かけて単回点滴静注*3	10 歳未満：20 mg、単回 10 歳以上：40 mg、単回
投与日数	可能な限り短期間	5 日間	5 日間	1 回 (重症例：症状に 応じて連日投与可)	1 回
有効型	A 型	A 型、B 型	A 型、B 型	A 型、B 型	A 型、B 型

\*1: 小児 ≥ 37.5 kg (10 歳以上の未成年患者には原則として使用禁止)

\*2: 適切に吸入できると判断された場合のみ。但し、4 歳以下に対する安全性は確立していない。

\*3: 重症化するおそれのある患者には 600 mg/日を 15 分以上かけて単回点滴静注、症状に応じて連日反復投与

ンパク質の機能を阻害することにより抗ウイルス作用を示す<sup>27), 28)</sup>。M2 タンパク質はA型インフルエンザウイルスにのみ存在するため、アマンタジンはA型にのみ有効とされているが、このA型に対しても高率に耐性化を生じさせることから<sup>29), 30)</sup>、現在ではインフルエンザ治療に対するアマンタジンの使用は控えられている<sup>31), 32)</sup>。一方、オセルタミビルやザナミビルをはじめとするNA阻害薬は、インフルエンザウイルスのエンベロープ表面上に存在するNAタンパク質の活性を阻害し、増殖したウイルスが宿主細胞から遊離する段階を抑制することにより抗ウイルス作用を示す<sup>33), 34)</sup> (Fig. 1.2)。NAタンパク質はA型およびB型インフルエンザウイルスに存在するため、NA阻害薬はどちらのウイルスにも有効で抗インフルエンザウイルス薬として広く処方されている(但し、NAタンパク質を有しないC型インフルエンザウイルスには無効)。このほか、開発段階あるいは承認申請段階にある新規メカニズムの薬剤も複数存在し<sup>35)</sup>、インフルエンザ医療における薬剤選択の幅がさらに広がることが期待されている。

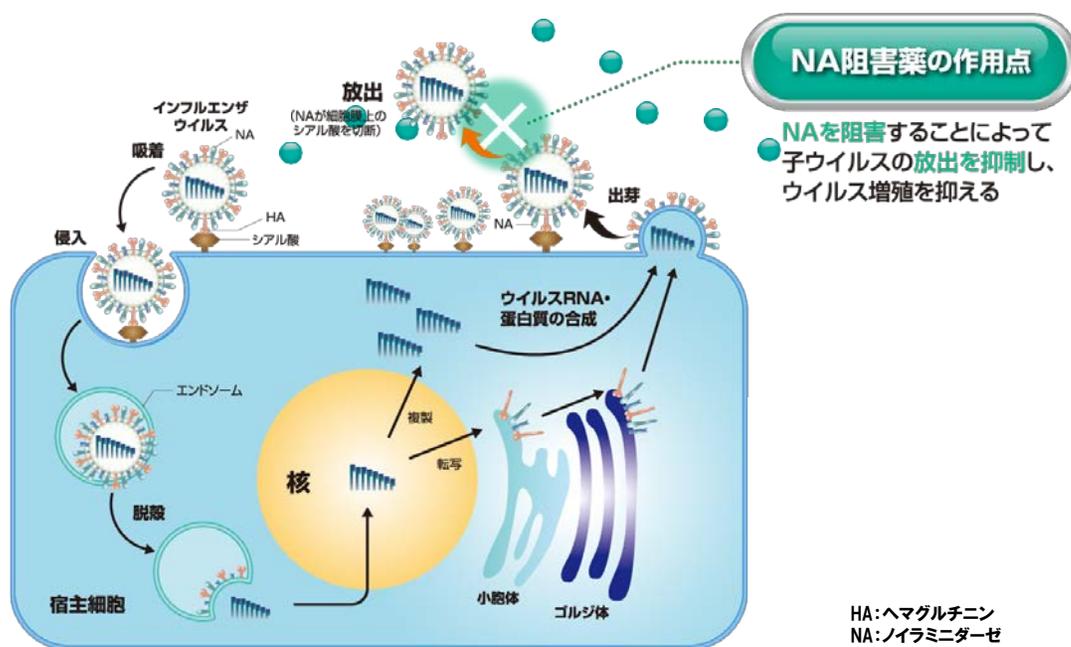


Fig. 1.2 ノイラミニダーゼ (NA) 阻害薬の作用機序

ラニナミビルオクタン酸エステル（以下、LO）は第一三共株式会社が創製・開発した NA 阻害薬で、活性体であるラニナミビル（以下、laninamivir）にオクタン酸エステルを付加したプロドラッグである（Fig. 1.3）。投与経路は吸入であり、原末と乳糖水和物との混合粉末を吸入用の容器内に直接充填したディスポーザブル型のキット製剤である。一般に吸入剤は、専用の吸入器を必要とすることや、吸入指導が必要であるという点においては経口剤に比べて簡便性に劣るものの、インフルエンザウイルスの増殖の場（標的器官）である気管や肺などの気道組織へと直ちに薬剤が到達・分布することによって効率的に効果を発揮できることや、標的器官以外の組織に対する不要な曝露を低減できるという利点を有している。当初、第一三共株式会社ではこの利点に着目し、シアル酸誘導体をリード化合物とする *in vitro* スクリーニングにより laninamivir を見出した。臨床ではオセルタミビルに耐性を示すインフルエンザウイルスの出現が報告されていたが<sup>36)-38)</sup>、この laninamivir はオセルタミビル耐性株に対しても優れた NA 阻害作用を有した<sup>39)</sup>。次に、オセルタミビルやザナミビルでは治療効果の発現に反復投与（1 日 2 回の投与を 5 日間）が必要である点に着目し、同等の治療効果を単回投与で達成できる化合物の取得を目指した。具体的には、laninamivir の側鎖 1 級水酸基に種々の疎水性官能基を導入した誘導体を合成し、インフルエンザウイルスのマウス感染モデルにおける延命作用を指標に薬効を評価した。その結果、オクタン酸エステルを付与した誘導体である LO が、マウス経鼻投与において laninamivir よりも優れた延命作用を示すことを見出した<sup>39),40)</sup>。また、オセルタミビル（経口投与）およびザナミビル（経鼻投与）がいずれも反復投与で作用を示すのに対し、LO は単回投与で治療的にも予防的にも優れた作用を示すことを確認した<sup>41)</sup>。さらに最近では、H1N1 型ブタ由来新型インフルエンザウイルスおよび高病原性 H5N1 型トリインフルエンザウイルスに対しても、LO の単回経鼻投与で抗ウイルス作用を示すことが確認されている<sup>42),43)</sup>。このような LO 投与による作用の持続は、ヒトにおいても同様に検証されている。すなわち、成人の A 型および B 型インフルエンザウイルス感染症患者を対象とした第 III 相試験（タミフル<sup>®</sup>カプセルを対照とした二重設盲検比較試験）ならびに 9 歳以下の小児を対象とした第 II/III 相試験（タミフル<sup>®</sup>ドライシロップを対照とした二重設盲検比較試験）において、いずれも LO の 1 回の吸入投与により有効性が証明された<sup>44),45)</sup>。これを受けて 2010 年 9 月に製造承認を取得し、2010 年 10 月より国内で発売されている。

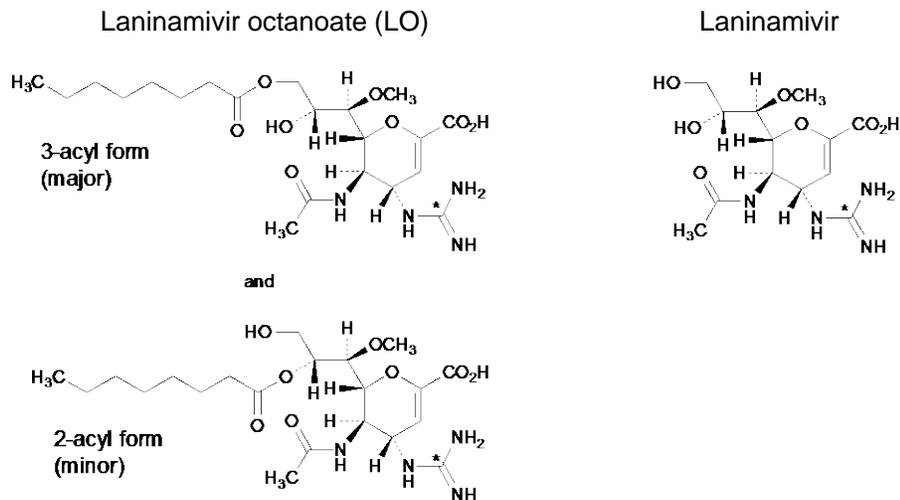


Fig. 1.3 Chemical structures of laninamivir octanoate (LO) and its active form laninamivir

When dissolved in water, LO is equilibrated at 9:1 (3-acyl form:2-acyl form). Hence, LO is defined as a mixture of the 3-acyl form (major) and the 2-acyl form (minor). The asterisk indicates the  $^{14}\text{C}$ -labeled position.

そこで本研究では、LO の投与がこのような作用の持続をもたらす要因とメカニズムを明らかにすることを企図して、マウスおよびラットを用いた薬物動態、なかでも標的器官である気管や肺における薬物の分布（貯留）や代謝（加水分解）に焦点を当てて検討した。以下に、本研究の検討事項を記述する。まず第2章では、マウスにLOを単回経鼻投与後の気管および肺における薬物動態について検討した。また、気管および肺ホモジネートの9,000 g 上清（S9）を用いて、LO から laninamivir への加水分解についても検討した。第3章では、ラットにLOを単回経気管投与後の薬物動態、特に気管および肺で生成される laninamivir の貯留とその貯留特性に起因する特徴的な血中動態ならびに排泄挙動、すなわち吸収速度律速に基づく laninamivir の血中滞留性と尿中排泄の持続化について検討した。第4章では、マウスで認められた laninamivir の気道貯留に関して、気管支肺胞洗浄やマイクロオートラジオグラフィーの手法を用いることにより細胞レベルでの局在性を検討した。さらに、気道上皮細胞の初代培養系を用いて細胞内における薬物挙動を調べることで、気道貯留のメカニズムを解明した。第5章では、第2～5章で得られた成果をもとに、気道貯留性を志向したプロドラッグに関する将来展望について考察した。第6章は、本研究で得られた知見をまとめたものである。

## 第2章 マウスにLOを単回経鼻投与後の気道貯留性

### 2.1 序論

LO は第一三共株式会社が創製・開発した新規 NA 阻害薬で、活性体である laninamivir にオクタン酸エステルを付加した吸入型プロドラッグである。Laninamivir は、A 型インフルエンザウイルス (A/Puerto Rico/8/34) のマウス感染モデルにおいて経鼻投与により抗ウイルス作用を示すものの、その作用の持続には類薬であるオセルタミビルやザナミビルと同様に反復投与が必要である。これに対し、プロドラッグの LO では作用が劇的に向上し、単回経鼻投与で十分な抗ウイルス作用を示す<sup>41)</sup>。そこで本章では、なぜ LO の投与によって作用の持続が認められるのかについて検討することを目的に、マウスに LO を単回経鼻投与し、標的器官である気道組織 (気管および肺) における薬物動態を検討した。また、気管および肺における薬物の貯留レベルを比較するため、LO の単回経鼻投与に加えて、活性体 laninamivir の単回経鼻投与ならびに類薬である zanamivir の単回経鼻投与についても検討した。さらにマウス気管および肺の S9 を用いて、LO から laninamivir への加水分解活性を *in vitro* で検討するとともに、この加水分解に参与する酵素について考察した。

### 2.2 全身オートラジオグラフィー

マウスに [<sup>14</sup>C]LO (0.5 μmol/kg) を単回経鼻投与し、投与後 168 h までの組織中放射能分布を全身オートラジオグラフィーにより評価した。さらに、活性体 [<sup>14</sup>C]laninamivir の単回経鼻投与ならびに類薬である [<sup>14</sup>C]zanamivir の単回経鼻投与についても併せて検討し、各時点における組織中放射能レベルを各化合物間で比較した。代表例として、投与後 6 h における全身オートラジオグラムを Fig. 2.1 に示す。投与した放射能は、いずれも気道組織 (気管および肺) に到達し、一部は嚥下により消化管 (胃あるいは小腸) へと移行していた。また、いずれの化合物投与においても、腎臓や膀胱尿に放射能が認められ、さらに [<sup>14</sup>C]LO 投与では肝臓にも放射能の分布が観察された。標的器官である気道組織に着目すると、気管および肺中の放射能レベルは、[<sup>14</sup>C]LO 投与の方が [<sup>14</sup>C]laninamivir 投与に比べて高く、プロドラッグ化によって薬物の貯留特性が大幅に向上していることが明らかとなった。さらに [<sup>14</sup>C]LO 投与では、[<sup>14</sup>C]zanamivir 投与よりも気管および肺中における放射能の貯留性が高く、この貯留レベルの差異が薬効の持続性に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

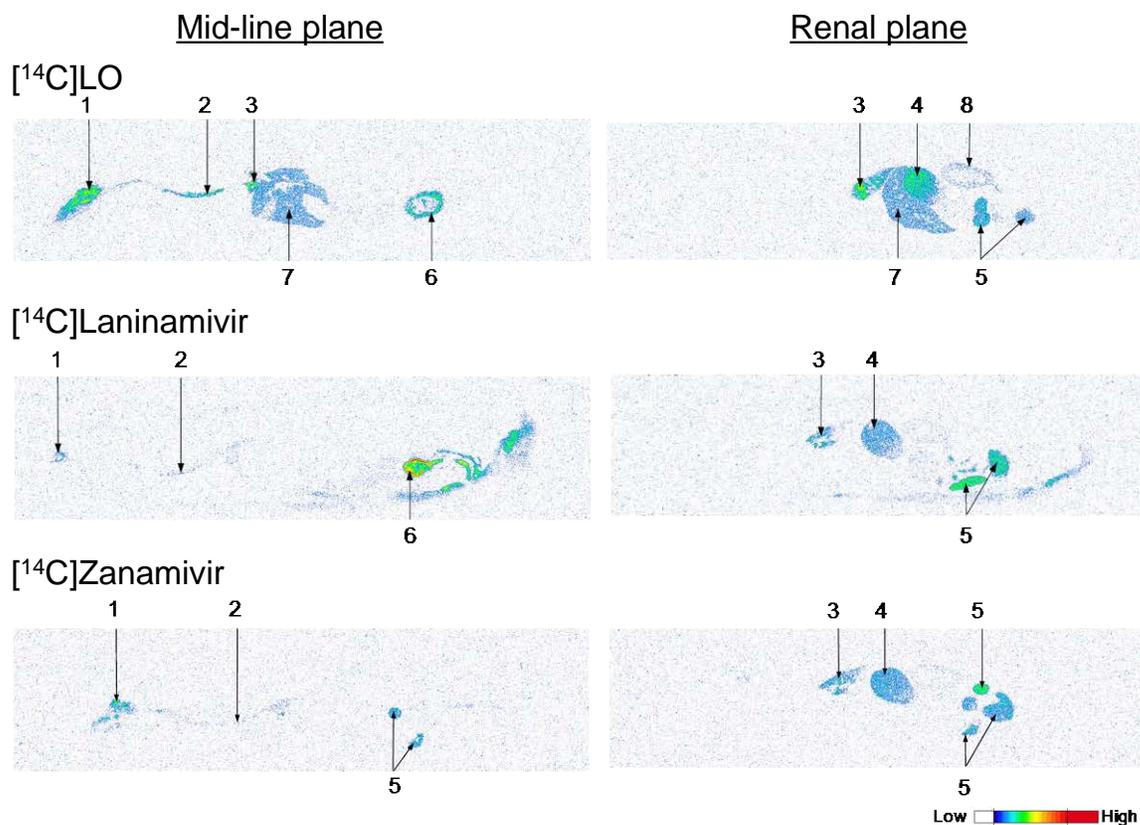


Fig. 2.1 Whole-body autoradiograms at 6 h after a single intranasal administration of [ $^{14}\text{C}$ ]LO, [ $^{14}\text{C}$ ]laninamivir, or [ $^{14}\text{C}$ ]zanamivir (0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) to mice

Numbers indicate the nasal cavity (1), trachea (2), lung (3), gastric contents (4), intestinal contents (5), urine in bladder (6), liver (7), and kidney (8). The dosing solutions of [ $^{14}\text{C}$ ]LO, [ $^{14}\text{C}$ ]laninamivir, and [ $^{14}\text{C}$ ]zanamivir were adjusted by dilution with corresponding unlabeled compounds to the same dosing radioactivity, 6.76  $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ .

### 2.3 気管および肺中放射能濃度の定量

前項において観察された気道組織への薬物貯留を定量的に比較するため、マウスに [ $^{14}\text{C}$ ]LO、 [ $^{14}\text{C}$ ]laninamivir、および [ $^{14}\text{C}$ ]zanamivir (いずれも 0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) を単回経鼻投与し、各時点において気管中および肺中の放射能濃度を測定した (Fig. 2.2)。投与後 0.25 h では、気管および肺中放射能濃度が 3 化合物間においてほぼ同程度で、それぞれ約 4 nmol eq./g および 30 nmol eq./g であった。このことから、鼻腔内に投与された化合物はいずれもほぼ同様に下気道へと移行し、気管および肺への薬物到達率には差が無いものと考えられた。一方、それ以降では、測定したいずれの時点 (投与後 1, 6, 24 h) においても [ $^{14}\text{C}$ ]LO 投与の方が [ $^{14}\text{C}$ ]laninamivir や [ $^{14}\text{C}$ ]zanamivir 投与に比べて高い放射能濃度で推移した。 [ $^{14}\text{C}$ ]LO の投与後 24 h における気管中および肺中の放射能濃度はそれぞれ 0.990 nmol eq./g および 5.57 nmol eq./g であり、いずれも [ $^{14}\text{C}$ ]laninamivir 投与および

[<sup>14</sup>C]zanamivir 投与に比べて 10 倍程度高かった。なお、zanamivir に関しては、マウスに経鼻投与後あるいはヒトに吸入投与後において、気道組織や循環血から薬物が速やかに消失することが報告されており<sup>46)-49)</sup>、今回の結果 (Fig. 2.1 および Fig. 2.2) はこれら過去の報告とも良く一致している。以上より、[<sup>14</sup>C]LO 投与では、[<sup>14</sup>C]laninamivir および [<sup>14</sup>C]zanamivir に比べて気道組織からの消失が緩やかであり、高い放射能が長時間にわたって貯留することが定量的に示された。なお、[<sup>14</sup>C]LO の投与後 24 h における肺中放射能濃度 (5.57 nmol eq./g) は、肺全体に存在する放射能量として 0.702 nmol eq.、投与した放射能量に対して 8.10%に相当する。

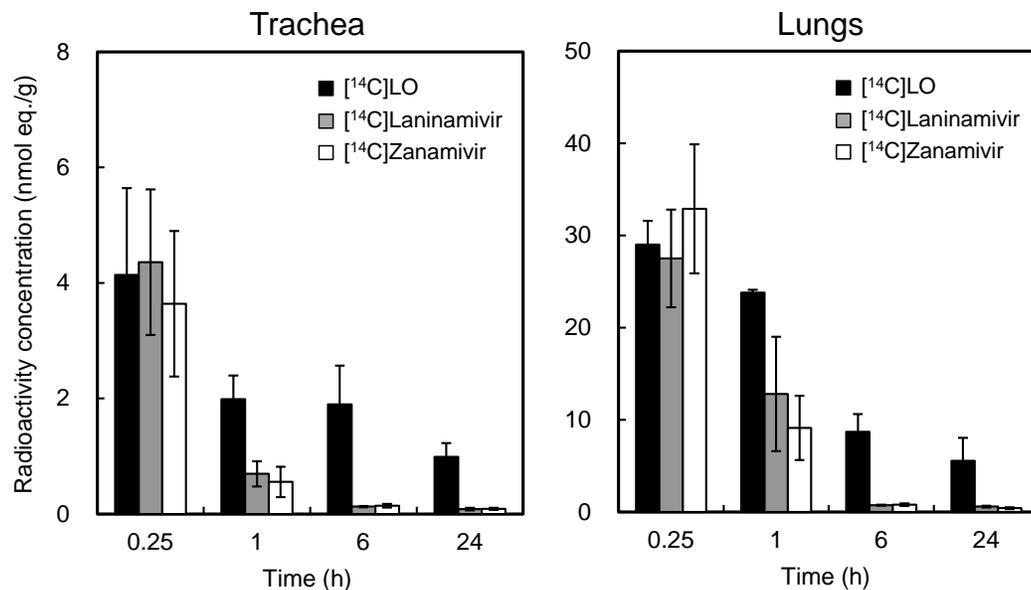


Fig. 2.2 Radioactivity concentrations in the trachea and lungs after a single intranasal administration of [<sup>14</sup>C]LO, [<sup>14</sup>C]laninamivir, or [<sup>14</sup>C]zanamivir (0.5 μmol/kg) to mice

Data represent the mean ± SD of four animals at each time point.

## 2.4 気管および肺中代謝物の同定

2.2 項および 2.3 項において認められた気道組織中の高い放射能について、その存在形態を明らかにするため、[<sup>14</sup>C]LO (3 μmol/kg) を単回経鼻投与したマウスより気管および肺を採取して [<sup>14</sup>C]LO 由来代謝物の化学構造を同定した。投与後 1 h および 24 h におけるラジオクロマトグラムを Fig. 2.3 に示す。投与後 1 h では、気管および肺のいずれにおいても、未変化体 (LO) の他に、活性代謝物として laninamivir が検出された。一方、投与後 24 h では、気管および肺に認められる放射能のほぼ全てが laninamivir であった。このことから、[<sup>14</sup>C]LO 投与において気道組織に貯留している放射能は、未変化体ではなく、laninamivir として存在していることが明らかとなっ

た。なお、投与後 1 h のラジオクロマトグラム上において、肺では LO の 2-アシル体ピークが認められるのに対して気管では認められないが、これは放射能の検出感度が影響しているものと考えられる。

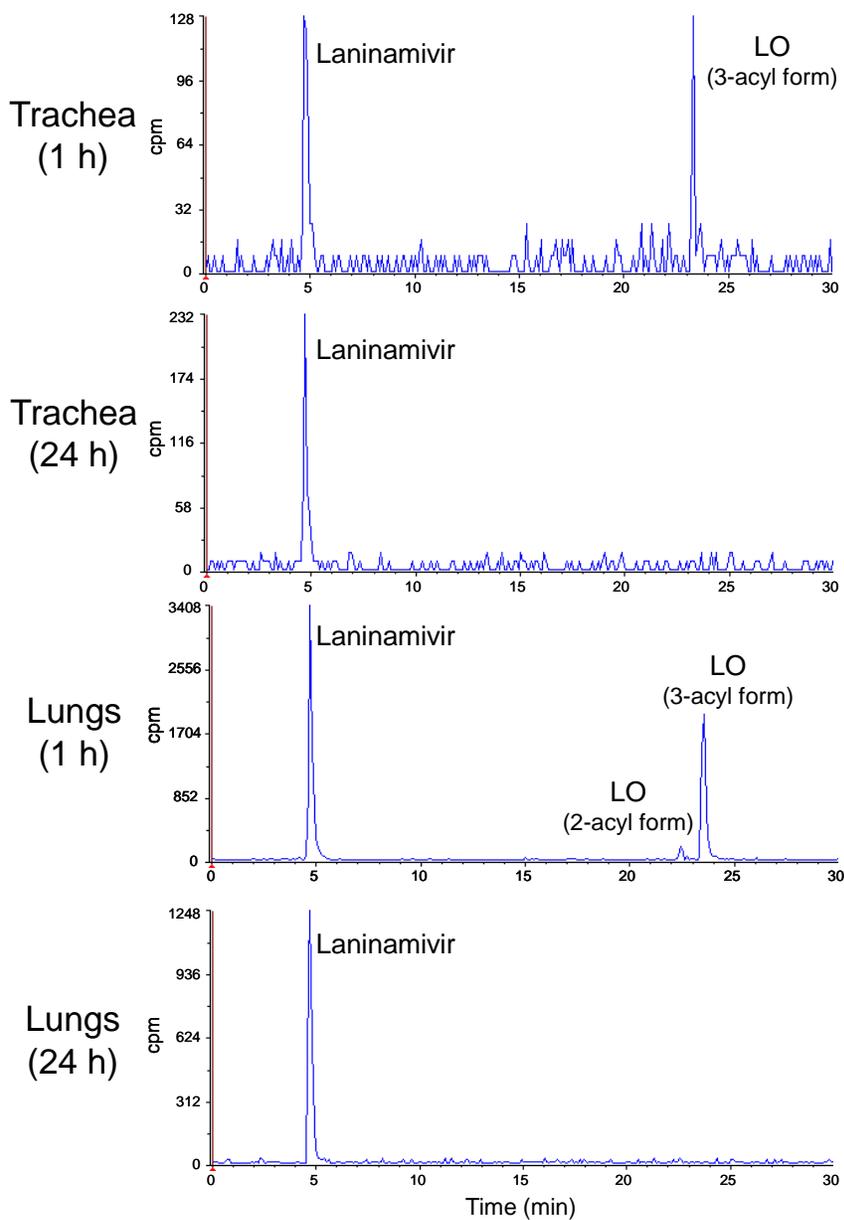


Fig. 2.3 Radiochromatograms of trachea and lung extracts at 1 and 24 h after a single intranasal administration of [ $^{14}\text{C}$ ]LO (3  $\mu\text{mol/kg}$ ) to mice

## 2.5 肺中薬物濃度推移

マウスに LO (0.5  $\mu\text{mol/kg}$ ) を単回経鼻投与後の肺中における薬物動態を検討した。肺中の LO および laninamivir 濃度推移を Fig. 2.4 に、薬物動態パラメータを Table 2.1 に示す。肺中 LO 濃度は、投与直後より速やかに消失し ( $t_{1/2}$ : 0.833 h)、投与後 24 h では定量下限 (0.02 nmol/g) 未満であった。一方、肺中 laninamivir 濃度は、投与後 3 h に  $C_{\text{max}}$  (6.41 nmol/g) に到達した後、非常に緩やかに消失し ( $t_{1/2}$ : 41.4 h)、投与後 120 h においても高い濃度 (0.915 nmol/g) を維持していた。以上より、LO の単回経鼻投与において、活性代謝物の laninamivir は高い濃度かつ長い半減期で気道組織に貯留することが示された。

以下に、インフルエンザウイルスのマウス感染モデルを用いた抗ウイルス作用と肺中薬物濃度との関連性について考察する。LO (0.5  $\mu\text{mol/kg}$ ) は、A 型インフルエンザウイルス (A/Puerto Rico/8/34) を感染させたマウスにおいて laninamivir や zanamivir よりも有意な延命作用を示し、さらに感染 7 日前の単回経鼻投与においても有意な延命作用を示すことが報告されている<sup>39)</sup>。ここで、Fig. 2.4 に示した LO (0.5 mmol/kg) の単回経鼻投与後の肺中 laninamivir 濃度推移 (投与後 5 日まで) から投与後 7 日における肺中 laninamivir 濃度を外挿して求めると 0.51 nmol/g となり、これは肺 1 g が 0.83 mL<sup>50)</sup>であると仮定すると 610 nM に相当する。この濃度は、A/ Puerto Rico/8/34 インフルエンザウイルスに対する laninamivir の  $\text{IC}_{50}$  値 (5.97 nM)<sup>39)</sup>に比べて約 100 倍高い。従って、投与後 7 日においても、気道組織には宿主細胞からのウイルスの遊離をほぼ完全に阻害できるほど十分な laninamivir が貯留しており、この laninamivir の貯留性が単回経鼻投与による作用の持続に寄与しているものと考えられる。

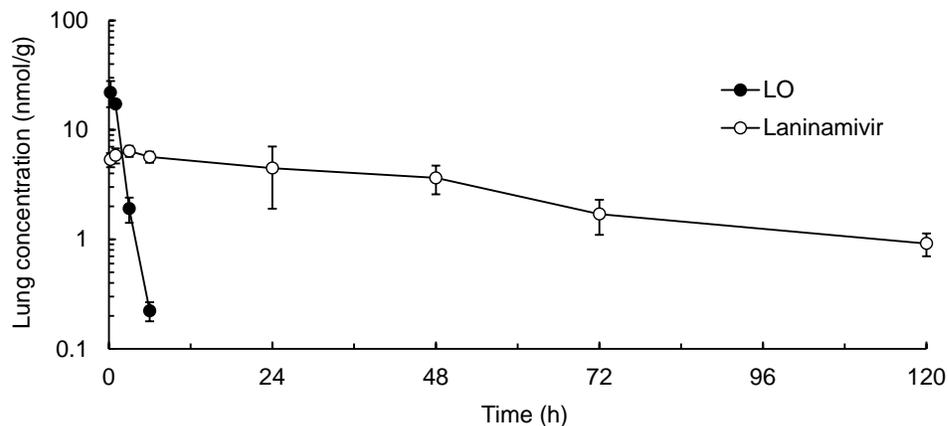


Fig. 2.4. Lung concentration-time profiles of LO and laninamivir after a single intranasal administration of LO (0.5  $\mu\text{mol/kg}$ ) to mice

The symbols and vertical bars represent the mean $\pm$ SD of three or four animals at each time point.

Table 2.1 Pharmacokinetic parameters of LO and laninamivir in the lungs after a single intranasal administration of LO (0.5  $\mu\text{mol/kg}$ ) to mice

Analyte	$C_{\text{max}}$ (nmol/g)	$t_{\text{max}}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)
LO	NC	NC	0.833
Laninamivir	6.41	3.0	41.4

NC, not calculated.

Each parameter was calculated from the mean value of three or four animals.

## 2.6 気管および肺S9におけるLOの加水分解

マウス気管および肺のホモジネートより調製した S9 を用いて、LO (10  $\mu\text{M}$ ) の加水分解活性を *in vitro* で調べると共に、各種エステラーゼ阻害剤が及ぼす影響を検討した (Table 2.2)。なお、用いたエステラーゼ阻害剤は、セリンエステラーゼ群を強力に阻害する有機リン化合物 DFP<sup>51)</sup>、カルボキシルエステラーゼの選択的阻害剤 BNPP<sup>52)</sup>、コリンエステラーゼ阻害剤 eserine<sup>53)</sup>、SH 基を有するエステラーゼの阻害剤 DTNB<sup>54)</sup> および PCMB<sup>55)</sup>、金属イオンキレート阻害剤 EDTA とした。肺 S9 では、LO の加水分解活性は 4.51 pmol/min/mg であり、この活性は DFP および BNPP によって強く阻害されたことから (それぞれ 13.6% of control および 21.0% of control)、LO の加水分解酵素としてカルボキシルエステラーゼが関与している可能性が示された。また、eserine 共存下においても中程度の阻害が認められたことから (31.9% of control)、コリンエステラーゼも一部関与している可能性が考えられた。DTNB 共存下においても LO の加水分解活性は低下したものの、EDTA および PCMB の添加では影響を受けなかったことから、SH 基を有するエステラーゼ (アシルエステラーゼなど) や金属イオンを有するエステラーゼの関与はほとんど無いものと推察された。一方、気管 S9 では、LO の加水分解活性が 1.01 pmol/min/mg であり、肺 S9 と同様に DFP による阻害が認められた。以上より、気道組織における LO の加水分解にはカルボキシルエステラーゼやコリンエステラーゼをはじめとする加水分解酵素が関与し、これらの酵素によって効率良く laninamivir が生成しているものと考えられた。なお、気管 S9 および肺 S9 における LO の加水分解活性はいずれも LO 濃度の上昇に伴って増加し、高濃度 (1000  $\mu\text{M}$ ) でもほとんど飽和しないことを確認している (データ不掲載)。

Table 2.2 Effects of various esterase inhibitors (1 mM) on the conversion of LO to laninamivir in mouse trachea and lung S9 fractions

Condition	Hydrolase activity (% of control)	
	Trachea S9	Lung S9
Control	100.0	100.0
DFP	44.1	13.6
Eserine	-	31.9
BNPP	-	21.0
DTNB	-	42.0
EDTA	-	130.7
PCMB	-	106.5

The control values for the hydrolase activities at 10  $\mu$ M LO were 1.01 and 4.51 pmol/min/mg in trachea and lung S9 fractions, respectively. Values are means for duplicate experiments.

-, not tested due to the limitation of the matrix.

DFP, diisopropylfluorophosphate; BNPP, bis-*p*-nitrophenylphosphate;

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; DTNB, 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid;

PCMB, *p*-chloromercuribenzoate.

## 2.7 小括

LO のマウス単回経鼻投与後における薬物動態検討ならびに *in vitro* 加水分解検討により、以下の知見を得た。

- 1) マウスに単回経鼻投与された LO は、標的器官である気道組織（気管や肺）で活性代謝物である laninamivir へと効率良く加水分解された。この加水分解にはカルボキシルエステラーゼやコリンエステラーゼをはじめとする加水分解酵素が関与している可能性が示された。
- 2) 加水分解により生成した laninamivir は気道組織に長時間にわたって貯留し、この貯留性は、laninamivir 自身の単回経鼻投与に比べて高かったことから、LO がプロドラッグ化の目的に適った望ましい貯留特性を有していることが明らかとなった。
- 3) さらにこの貯留性は類薬の zanamivir よりも高かったことから、この特長が LO の単回投与による抗ウイルス作用の持続に寄与しているものと考えられた。

本研究では、高い気道貯留性という特長的な薬物動態特性が薬理作用の持続に大きく寄与していることを示すものであり、しかもこの気道貯留性が laninamivir をプロドラッグ化 (LO) したことによってはじめて獲得される性質であることを明らかにした。なお、この気道貯留に関する詳細なメカニズムについては、別途第 4 章に掲載する。

## 第3章 ラットにおける気道貯留性に起因した血中動態と排泄挙動

### 3.1 序論

前章では、NA 阻害活性を有する laninamivir が、プロドラッグ化 (LO) によって高い気道貯留性を示すようになり、このような標的器官における薬物貯留の向上が LO の単回経鼻投与による抗ウイルス作用の持続に大きく寄与していることを明らかにした。ヒトにおいても LO が単回投与で十分な治療効果を発揮しうるかどうかを早期に見極めるためには、ヒトの気管中あるいは肺中における薬物挙動を知ることが極めて重要であるものの、これらの気道組織における薬物濃度を非侵襲的に評価することは困難である。そこで本章では、ラットに LO を単回経気管投与後の薬物動態、すなわち気道組織 (気管および肺) における薬物貯留のほか、循環血中における薬物動態ならびに排泄挙動について評価することにより、気道組織で認められる laninamivir の高い貯留性が血中動態や排泄挙動にどのように反映されるかを検討した。なお、循環血中における LO および laninamivir の薬物動態を把握するため、両化合物のラット単回静脈内投与も併せて実施した。また、ラットの LO 単回経気管投与より得られたデータを基に肺中薬物量と尿中排泄薬物量との関係性についても考察した。

### 3.2 組織中放射能濃度推移

ラットに [ $^{14}\text{C}$ ]LO (0.2 mg/kg) を単回経気管投与し、組織摘出法により主要な組織における放射能の分布を検討した (Table 3.1)。投与直後では、主として気管および肺に高い放射能濃度が認められ、放射能が気管内への投与を介して気道組織へと広く移行した。投与後 1 h 以降においては、放射能が主として肺に認められたほか、気管、肝臓、および腎臓にも認められ、この傾向はマウスに単回経鼻投与した場合 (Fig. 2.1) とほぼ同様であった。また、肺中における放射能濃度の消失は非常に緩やかであり、 $t_{1/2}$  は 23.2 h であった。投与後 24 h および 48 h における肺中放射能濃度は高く (それぞれ 7.057  $\mu\text{g eq./g}$  および 3.051  $\mu\text{g eq./g}$ )、これらの肺中放射能は投与量の 19.12% および 8.56% に相当した。なお、大脳および小脳では放射能濃度が低かったことから (投与後 24 h 以降では検出できず)、本薬の脳移行性は非常に低いと考えられた。

Table 3.1 Tissue concentrations of radioactivity after a single intratracheal administration of [<sup>14</sup>C]LO (0.2 mg/kg) to rats

Tissue	Radioactivity concentration (µg eq./g or mL)						
	0.25 h	0.5 h	1 h	3 h	6 h	24 h	48 h
Plasma	0.091	0.075	0.071	0.046	0.016	0.003	0.000
Blood	0.041	0.036	0.038	0.024	0.009	0.000	0.000
Cerebrum	0.004	0.002	0.006	0.005	0.001	0.000	0.000
Cerebellum	0.007	0.002	0.008	0.006	0.002	0.000	0.000
Eyeball	0.009	0.007	0.011	0.009	0.004	0.000	0.000
Thyroid gland	0.253	0.034	0.041	0.025	0.000	0.000	0.000
Submandibular gland	0.033	0.017	0.018	0.016	0.008	0.003	0.002
Lymphatic node	0.025	0.017	0.026	0.025	0.015	0.004	0.007
Thymus	0.014	0.013	0.015	0.018	0.012	0.006	0.005
Heart	0.079	0.064	0.096	0.064	0.014	0.004	0.001
Lungs	27.645 [80.22]	26.997 [81.55]	22.867 [67.99]	18.202 [49.54]	10.562 [27.62]	7.057 [19.12]	3.051 [8.56]
Trachea	6.317	4.400	0.318	0.152	0.158	0.075	0.035
Liver	0.158	0.250	0.449	0.912	1.087	0.214	0.081
Kidney	0.190	0.252	0.290	0.430	0.357	0.090	0.033
Adrenal gland	0.015	0.018	0.024	0.016	0.007	0.000	0.003
Spleen	0.011	0.010	0.011	0.011	0.007	0.005	0.003
Pancreas	0.015	0.013	0.025	0.027	0.025	0.005	0.002
White fat	0.007	0.007	0.007	0.006	0.003	0.001	0.001
Brown fat	0.024	0.017	0.017	0.013	0.008	0.002	0.002
Skeletal muscle	0.007	0.006	0.006	0.005	0.003	0.001	0.000
Testis	0.006	0.014	0.009	0.008	0.004	0.002	0.001

Values are means of three or four animals at each time point. In the lungs, the values in parentheses represent the ratio of radioactivity to the administered dose (% of dose).

### 3.3 気管中および肺中代謝物の同定

[<sup>14</sup>C]LO の単回経気管投与後に気道組織に貯留している放射能の存在形態を明らかにするため、[<sup>14</sup>C]LO (0.3 mg/kg) を単回経気管投与したラットより気管および肺を採取し、[<sup>14</sup>C]LO 由来代謝物の化学構造を同定した (Fig. 3.1)。投与後 1 h では、気管および肺のいずれにおいても未変化体 (LO) のほかに、活性代謝物として laninamivir が検出された。一方、投与後 24 h では、いずれも laninamivir のみが検出された。このことから、マウスと同様に (Fig. 2.3)、ラットでも LO が気道組織において laninamivir へと変換 (加水分解) されて長時間貯留することが示された。

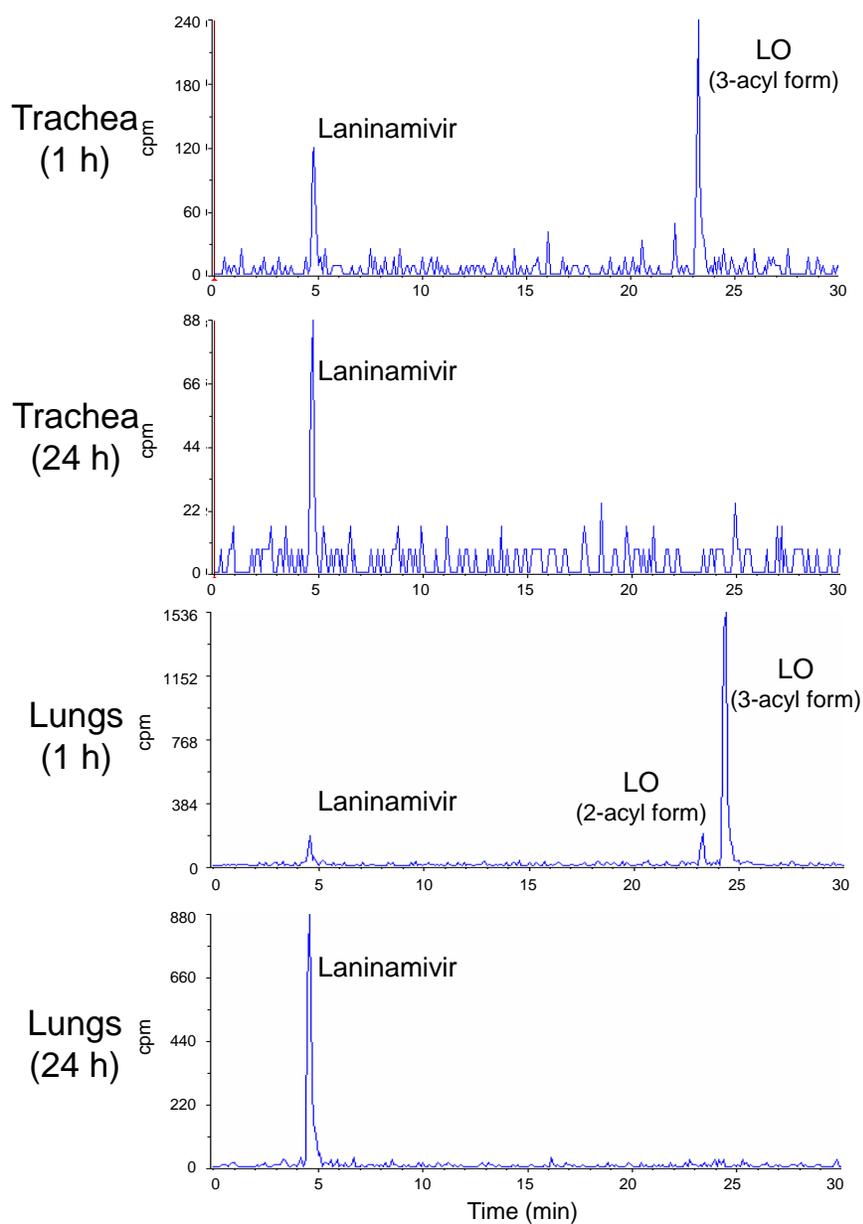


Fig. 3.1 Radiochromatograms of trachea and lung extracts at 1 h and 24 h after a single intratracheal administration of [ $^{14}\text{C}$ ]LO (0.3 mg/kg) to rats

### 3.4 血漿中薬物濃度推移

ラットに LO (0.1, 0.2, 0.4 mg/kg) を単回経気管投与し、血漿中の薬物動態を検討した。LO および laninamivir の血漿中濃度推移を Fig. 3.2 に、PK パラメータを Table 3.2 に示す。加えて、LO (0.4 mg/kg) および laninamivir (0.4 mg/kg) の単回静脈内投与時における血漿中の薬物動態に

についても検討し、それらの PK パラメータも Table 3.2 に示す。LO の単回経気管投与において、LO の一部は気道組織での加水分解を逃れて循環血へと吸収され、血漿中 LO 濃度は投与後 0.5～0.7 h で  $C_{max}$  に達した。その後速やかに消失し、 $t_{1/2}$  は 0.8～0.9 h であった。一方、血漿中 laninamivir 濃度は投与後 1.0～2.0 h に  $C_{max}$  に達した後、LO よりも緩やかに消失し、0.4 mg/kg の投与量における  $t_{1/2}$  は 14.1 h であった（低投与量では、定量下限 [1 ng/mL] による影響のため  $t_{1/2}$  が短い）。LO および laninamivir の曝露量 ( $C_{max}$  と  $AUC_{last}$ ) はいずれも投与量に比例して増加したことから、血漿中の薬物動態は線形であった。なお、LO 経気管投与後の循環血中には未変化体 (LO) および laninamivir のみが存在し、それ以外の代謝物は無いことを確認している（データ不掲載）。

以下に、LO の単回経気管投与後に認められた血漿中 laninamivir の長い  $t_{1/2}$  について、その要因を考察する。LO の単回経気管投与後における laninamivir の  $t_{1/2}$  は 14.1 h であり、これは laninamivir の単回静脈内投与時における  $t_{1/2}$  (0.5 h) よりも非常に長かった。このことから、気道組織から循環血への laninamivir 吸収速度が律速になっていると考えられる (flip-flop 現象)。一方、LO の単回静脈内投与時においても laninamivir の  $t_{1/2}$  が長かったことから (10.6 h)、循環血中の LO は、その一部が肝臓や腎臓などに分布し、これらの組織で laninamivir へと加水分解された後、再び循環血中へと徐々に移行するものと推測される。実際、 $[^{14}C]$ LO の単回経気管投与では、気道組織のほかに肝臓や腎臓への放射能分布も観察されており (Table 3.1)、さらにいずれの組織でも放射能の多くが laninamivir として存在することを確認している（データ不掲載）。また、LO の単回静脈内投与では、気道組織への薬物分布がほとんど認められないことから（データ不掲載）、経気管投与において認められる気道組織での薬物貯留は気道空間からの薬物移行を介して起こる現象であると考えられた。

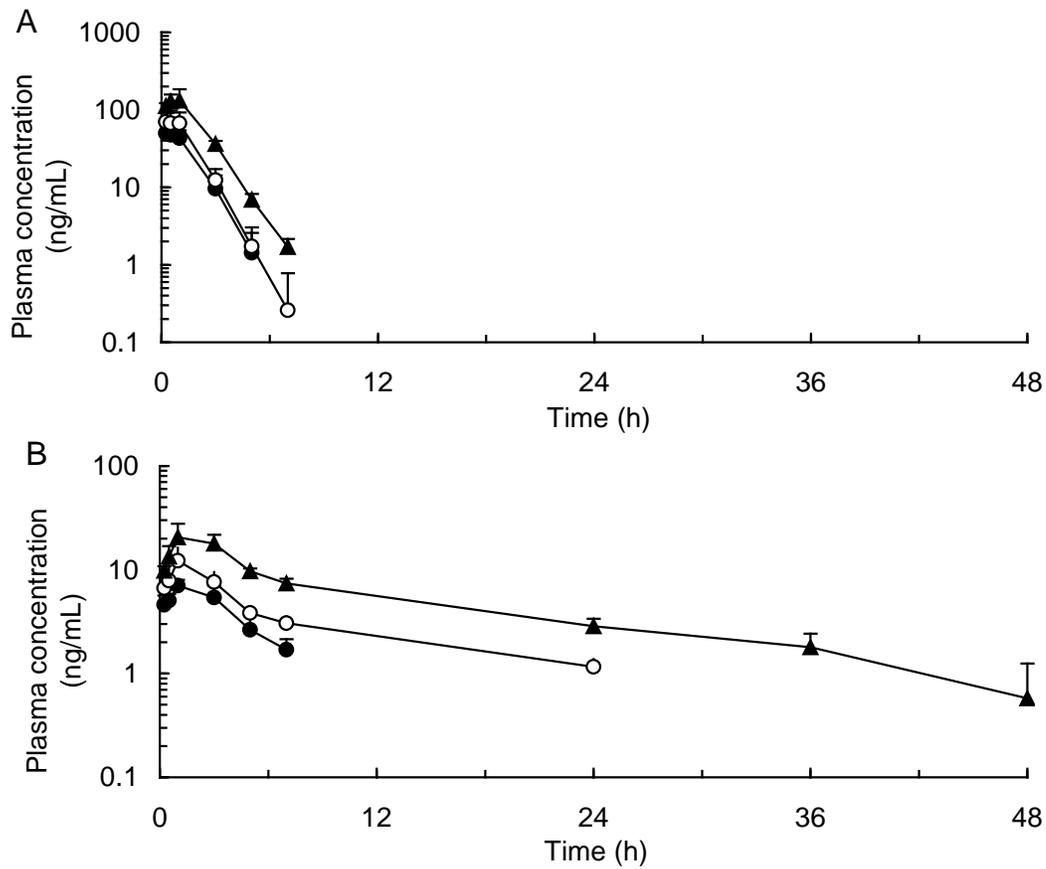


Fig. 3.2 Plasma concentration-time profiles of LO (A) and laninamivir (B) after a single intratracheal administration of LO to rats at doses of 0.1 (●), 0.2 (○), and 0.4 mg/kg (▲)

The symbols and vertical bars represent the mean±SD of four animals.

Table 3.2 Pharmacokinetic parameters and bioavailability (F) of LO and laninamivir in rats

Test compound	Route	Dose (mg/kg)	Analyte	C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (h)	T <sub>1/2</sub> (h)	CL (mL/min/kg)	V <sub>ss</sub> (mL/kg)	AUC <sub>last</sub> (ng·h/mL)	AUC <sub>0-inf</sub> (ng·h/mL)	F (%)
LO	i.t.	0.1	LO	52.9	0.7	0.8	-	-	104	107	-
			laninamivir	7.03	1.0	3.0	-	-	29.6	37.1	-
		0.2	LO	74.6	0.5	0.8	-	-	152	156	-
			laninamivir	12.2	1.0	11.6	-	-	81.7	102	-
		0.4	LO	143	0.6	0.9	-	-	330	332	52.1
			laninamivir	21.0	2.0	14.1	-	-	219	228	30.1
LO	i.v.	0.4	LO	-	-	0.4	10.5	239	636	637	-
			laninamivir	128	0.1	10.6	-	-	225	266	-
Laninamivir	i.v.	0.4	laninamivir	-	-	0.5	6.75	211	993	994	-

i.t., intratracheal; i.v., intravenous; -, not applicable.

### 3.5 尿糞中および胆汁中排泄

ラットに $[^{14}\text{C}]\text{LO}$  (0.2 mg/kg) を単回経気管投与し、尿中および糞中への放射能排泄率を検討するとともに (Fig. 3.3A)、これら生体試料中の放射能に占める LO および laninamivir の存在割合を調べた (Table 3.3)。その結果、投与後 168 h までの尿中および糞中への放射能排泄率はそれぞれ 67.5% および 29.6% であり、主たる排泄経路は尿中であることが示された。尿中の放射能は投与後 24 h 以降においても持続しており、しかも投与後 6 h 以降の尿中放射能は主として laninamivir として存在していることから (Table 3.3)、laninamivir が尿中へと持続的に排泄されていることが明らかとなった。また、3.4 項で求めた laninamivir の血漿中 CL を血漿中蛋白結合率 (2% 未満) で補正した値は糸球体濾過速度 (5.24 mL/min/kg)<sup>49)</sup> にほぼ近いことから、その排泄は糸球体濾過が主であると考えられた。

一方、胆管カニューレを施したラットに $[^{14}\text{C}]\text{LO}$  (0.2 mg/kg) を単回経気管投与したところ、胆汁中には糞中に排泄される放射能の多くが排泄されたことから (Fig. 3.3B)、糞中への排泄は胆汁を介していることが示された。また、糞中には主として laninamivir が存在したのに対し、胆汁には LO として排泄された (Table 3.3)。このことから、LO は胆汁を介して腸管内へと排泄された後、腸内細菌の酵素によって加水分解を受けて糞中へと排泄されると推察された。

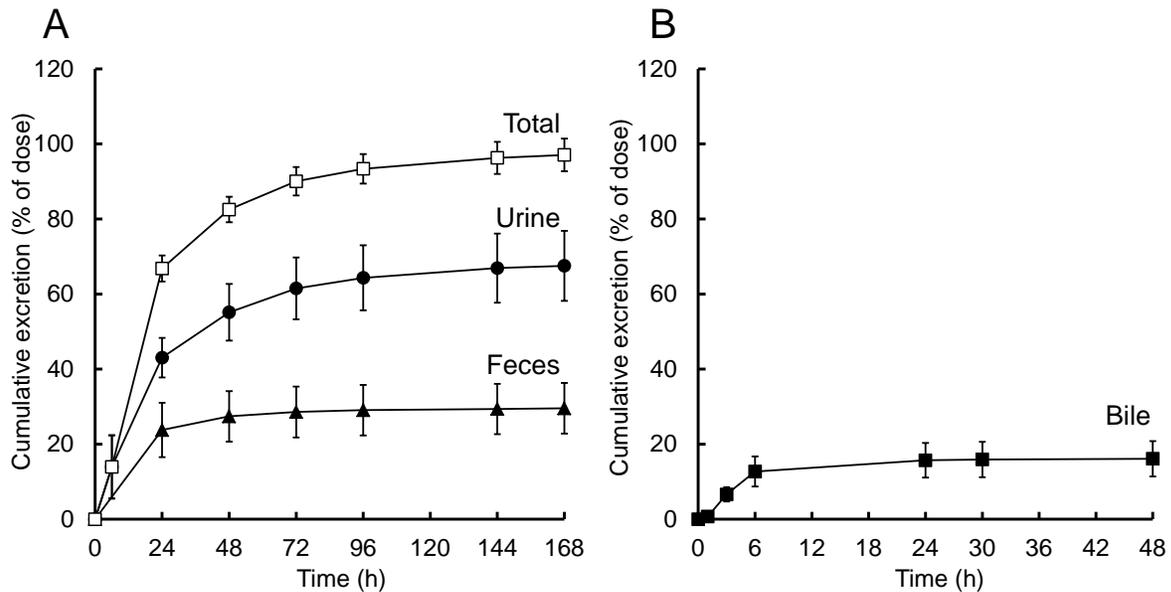


Fig. 3.3 Urinary/fecal excretion (A) and biliary excretion (B) of radioactivity after a single intratracheal administration of  $[^{14}\text{C}]\text{LO}$  (0.2 mg/kg) to rats

The symbols and vertical bars represent the mean $\pm$ SD of three or four animals.

Table 3.3 Ratios of unchanged LO and laninamivir in urine, feces and bile after a single intratracheal administration of [<sup>14</sup>C]LO (0.2 mg/kg) to rats

Matrix	Time (h)	Radioactivity (%)	
		LO	Laninamivir
Urine	0-6	64.4 ± 10.8	26.2 ± 11.4
	6-24	22.0 ± 12.7	72.4 ± 11.6
	24-48	4.7 ± 2.0	87.5 ± 3.1
Feces	0-24	9.4 ± 2.7	72.1 ± 7.8
Bile	0-1	84.9 ± 2.5	3.6 ± 1.3
	1-3	82.2 ± 2.3	3.5 ± 0.9
	3-6	72.4 ± 1.9	7.1 ± 1.8

Values represent the mean±SD of three or four animals.

### 3.6 肺中薬物量と尿中排泄薬物量との関連性

3.1～3.5 項より、気道組織に貯留する laninamivir は循環血へと徐々に吸収され (flip-flop 現象)、これによって laninamivir が血漿中で長く滞留するとともに、尿中への排泄も持続的であることが示された。そこで、肺に存在する laninamivir のうち、どの程度が尿中への持続的排泄に寄与しているかを調べるため、投与後 48 h 以降の放射能データを用いて、肺貯留と尿中排泄のマスバランスを以下に検討した。肺中における放射能の存在率は、投与後 48 h において投与量の 8.56% であり (Table 3.1)、かつ投与後 24 h における肺中放射能のほぼ 100% が laninamivir であったことから (Fig. 3.1)、48 h における放射能存在率 8.56% のうちその全てが laninamivir として存在しているものと考えた。一方、尿中への放射能排泄率をみると、投与後 48～168 h では投与量の 12.4% (= 67.5-55.1) が尿中へと排泄された (Fig. 3.3A)。ここで、投与後 24～48 h までに回収された尿中では放射能の大部分 (87.5%) が laninamivir であったことから (Table 3.3)、投与後 48 h 以降の尿中放射能排泄率 12.4% は、その全てが laninamivir として存在しているものと見なした。これより、投与後 48 h における肺中の laninamivir 量 (8.56%) が投与後 48 h 以降の尿中 laninamivir 排泄率 (12.4%) に占める割合は約 70% (= 8.56/12.4×100) と算出された。すなわち、尿中に排泄された laninamivir のうち約 70% は、肺に存在する laninamivir が循環血への吸収を介して尿中へと排泄されたものと考えられ、ヒトにおける血漿中の薬物動態あるいは尿中への薬物排泄挙動を調べることにより、ヒトに LO を吸入投与後の気道貯留性を間接的に評価できる可能性が考えられた。なお、残りの約 30% については、肝臓や腎臓などの組織に由来しているものと推察される (3.4 項参照)。

### 3.7 小括

ラットに LO を単回経気管投与後における薬物動態を検討した結果、以下の知見を得た。

- 1) ラットに経気管投与された LO は、laninamivir に変換（加水分解）されて気道組織（気管や肺）に貯留した。気道組織に貯留する laninamivir は徐々に循環血へと吸収されたのち、さらなる代謝を受けることなく主として尿中へと排泄された。
- 2) Laninamivir の循環血からの緩やかな消失ならびに尿中への持続的な排泄は、気道組織から循環血中への吸収速度を反映しているものと考えられた（flip-flop 現象）。従って、血漿中の laninamivir 濃度推移や尿中への laninamivir 排泄を調べることにより、気道組織における laninamivir の貯留性を間接的に評価可能であることが示された。

実際に、臨床試験において LO の単回吸入投与後の血漿中薬物濃度ならびに尿中薬物排泄を検討した結果、血漿中において laninamivir が長い  $t_{1/2}$  を示すとともに、尿中へも持続的に排泄されることが確認された<sup>56)</sup>。このことから、ヒトでも laninamivir が気道組織中に貯留しているものと推察される。さらに最近では、ヒトの肺胞粘液中や肺胞マクロファージ中においても laninamivir が高い濃度で推移していることが確認できており<sup>57)</sup>、気道組織での薬物貯留をより直接的に裏付けるデータが取得できている。

## 第4章 マウスを用いた気道貯留メカニズムの解明

### 4.1 序論

第2章では、プロドラッグ化 (LO) によって活性体 laninamivir の高い気道貯留性が達成され、この優れた貯留特性が薬理作用の持続に大きく寄与していることを明らかにした。そこで本章では、この高い気道貯留のメカニズムを明らかにする目的で、マウス肺中における薬物挙動を *in vivo* および *in vitro* で詳細に検討した。まず *in vivo* では、LO と laninamivir をそれぞれマウスに単回経鼻投与し、気管支肺胞洗浄法 (bronchoalveolar lavage [BAL] 法) により肺上皮粘液 (epithelial lining fluid [ELF]) と肺組織とを区別して採取し、各試料中の薬物動態を両化合物で比較するとともに、血漿中の薬物動態も検討した。ELF は気道組織表面を被覆する粘液層で、異物排除において重要な役割を担っている。すなわち、粉塵やウイルスなどの異物が気道空間内に吸い込まれると、気道粘膜から分泌される粘液にからめ取られ、さらに線毛運動による粘液層の流れによって咽頭へ向けて排出される<sup>58), 59)</sup> (肺胞まで侵入した際は肺胞マクロファージにより貪食される)。BAL 法は、この ELF を洗浄により回収する手法であり<sup>60)</sup>、臨床において呼吸器疾患の診断に広く用いられるほか、感染部位における薬物濃度の測定などにも利用されている。薬物濃度測定では、主に抗菌剤の感染部位における PK/PD 解析などに適用されているほか<sup>61)</sup>、最近では抗真菌剤、抗結核剤、抗寄生虫剤、抗ウイルス剤のような他の抗感染薬にも利用されている<sup>62)</sup>。NA 阻害薬の場合においても、ターゲット酵素である NA がインフルエンザウイルス表面に存在していること、インフルエンザウイルスが宿主細胞から遊離する段階を抑制することなどを考慮すると (Fig. 1.1)、ELF 中の薬物濃度を検討することが PK/PD の観点から重要であると考えられる。また本章では、肺での薬物挙動に関する検討の一環として、マイクロオートラジオグラフィーにより、投与した [<sup>14</sup>C]LO の気道組織中における局在性を細胞レベルで検討した。さらに、マウス肺より調製した気道上皮細胞の初代培養系を用いて、LO の細胞内取り込みと細胞内における挙動 (加水分解を含む) について検討すると共に、貯留メカニズムの解明に向けた速度論的な解析も実施した。

### 4.2 ELF中、肺組織中、および血漿中薬物濃度推移

マウスに LO および laninamivir (いずれも 0.5  $\mu\text{mol/kg}$ ) を単回経鼻投与し、ELF 中、肺組織中、および血漿中における薬物濃度推移を比較した。LO 投与後および laninamivir 投与後の薬物濃度推移をそれぞれ Fig. 4.1 および Fig. 4.2 に、算出された薬物動態パラメータを Table 4.1 にまとめて示す。LO 投与では、ELF 中の LO 濃度が速やかに減衰する一方 ( $t_{1/2}$ : 1.1 h)、ELF 中の laninamivir 濃度は投与後 1 h で  $C_{\text{max}}$  (1520 pmol/mL) に達した後、徐々に減衰した ( $t_{1/2}$ : 25.1 h)。

同様に、肺組織中の LO 濃度は速やかに消失したのに対し、肺組織中の laninamivir は高い濃度で長時間維持した ( $t_{1/2}$ : 30.9 h)。血漿中では、LO 濃度が投与後速やかに認められ ( $t_{max}$ : 0.5 h)、消失も速やかだった ( $t_{1/2}$ : 0.6 h)。血漿中の laninamivir 濃度は、投与後 1 h に  $C_{max}$  に達した後、二相性を示して消失した (終末相の  $t_{1/2}$ : 13.1 h)。ここで、最終時点の 24 h における laninamivir 濃度に着目すると、ELF (842 pmol/mL) だけでなく肺組織 (2680 pmol/g) においても高い濃度を示したことから、肺組織内に薬物が貯留しているものと考えられた。

一方、laninamivir 投与においては、投与初期における ELF 中の薬物消失が非常に速く、投与後 4 h における ELF 中 laninamivir 濃度は 51.3 pmol/mL まで低下した。この laninamivir 濃度は、LO 投与後 4 h における laninamivir 濃度 (1150 pmol/mL) に比べて非常に低いことから (1/22 倍)、LO 投与よりも速やかな消失であった。肺組織中の laninamivir 濃度は投与後 0.25 h に  $C_{max}$  (1020 pmol/g) を示し、徐々に消失した ( $t_{1/2}$ : 25.0 h)。血漿中では laninamivir 濃度が投与後 0.5 h に  $C_{max}$  に達した後、経時的に低下し、投与後 8 h では定量下限未満であった。

投与後 24 h における肺組織中の laninamivir 濃度を両化合物で比較すると、LO 投与 (2680 pmol/g) の方が laninamivir 投与 (282 pmol/g) に比べて 9.5 倍高く、ELF 中および血漿中においても LO 投与の方が laninamivir 投与に比べて高い濃度を示した。これは恐らく、LO 投与の方が ELF を通過して肺組織内に到達する割合が高く、さらに肺組織中で生成した laninamivir が ELF 中あるいは循環血中へと徐々に移行するために、ELF 中や血漿中においても laninamivir が滞留しているものと推察される。なお、前述のとおり (4.1 項)、NA 阻害薬の作用機序を考慮すると、抗ウイルス作用の発現には ELF 中の薬物濃度が重要であると考えられる。そこで、LO 投与後の ELF 中 laninamivir 濃度と  $IC_{50}$  値<sup>39)</sup>とを比較すると、ELF 中の laninamivir は多くの亜型インフルエンザウイルスの  $IC_{50}$  値に比べて非常に高い濃度で推移していることから、ELF 中の薬物濃度を考慮しても抗ウイルス作用の持続を説明可能であると考えられる。

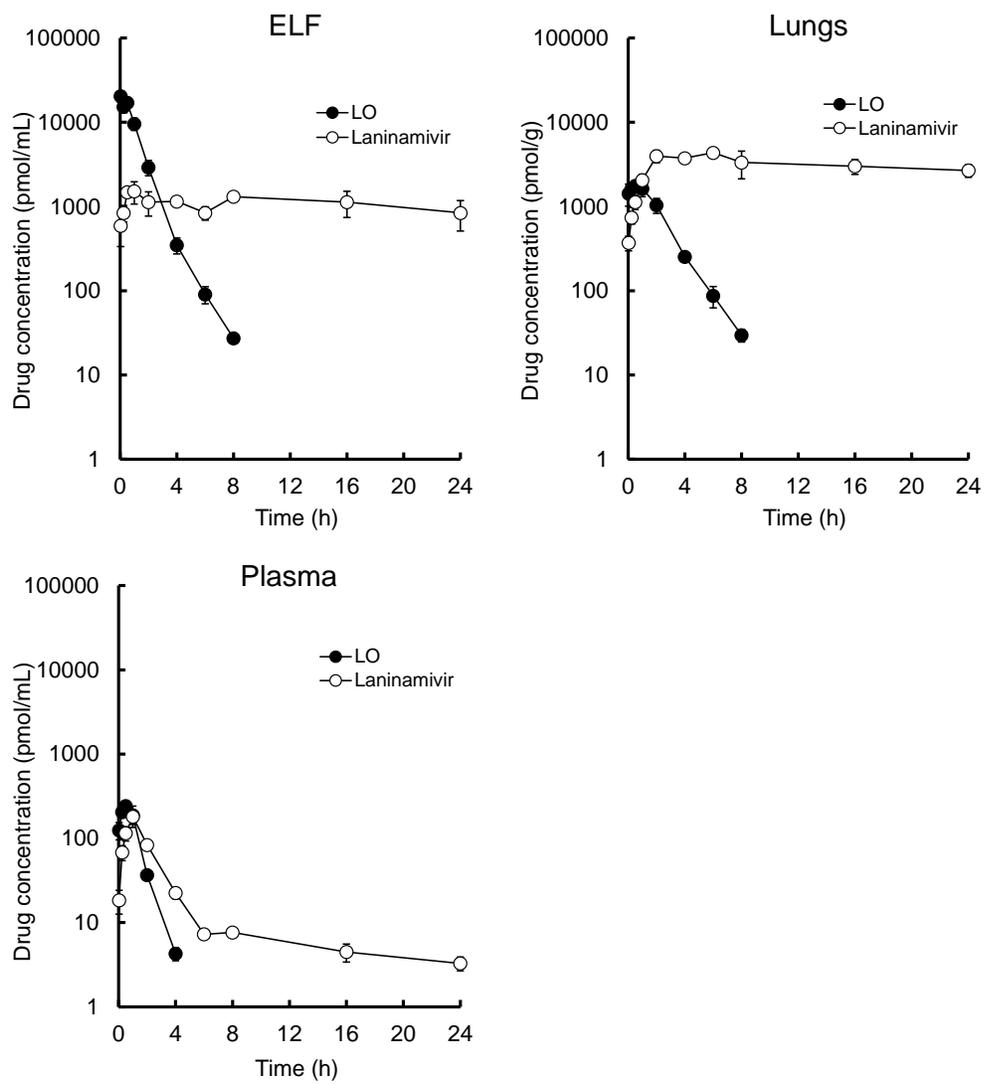


Fig. 4.1 Drug concentration-time profiles in ELF, lungs, and plasma after a single intranasal administration of LO (0.5  $\mu\text{mol/kg}$ ) to mice

The symbols and vertical bars represent the mean $\pm$ SD of three or four animals at each time point.

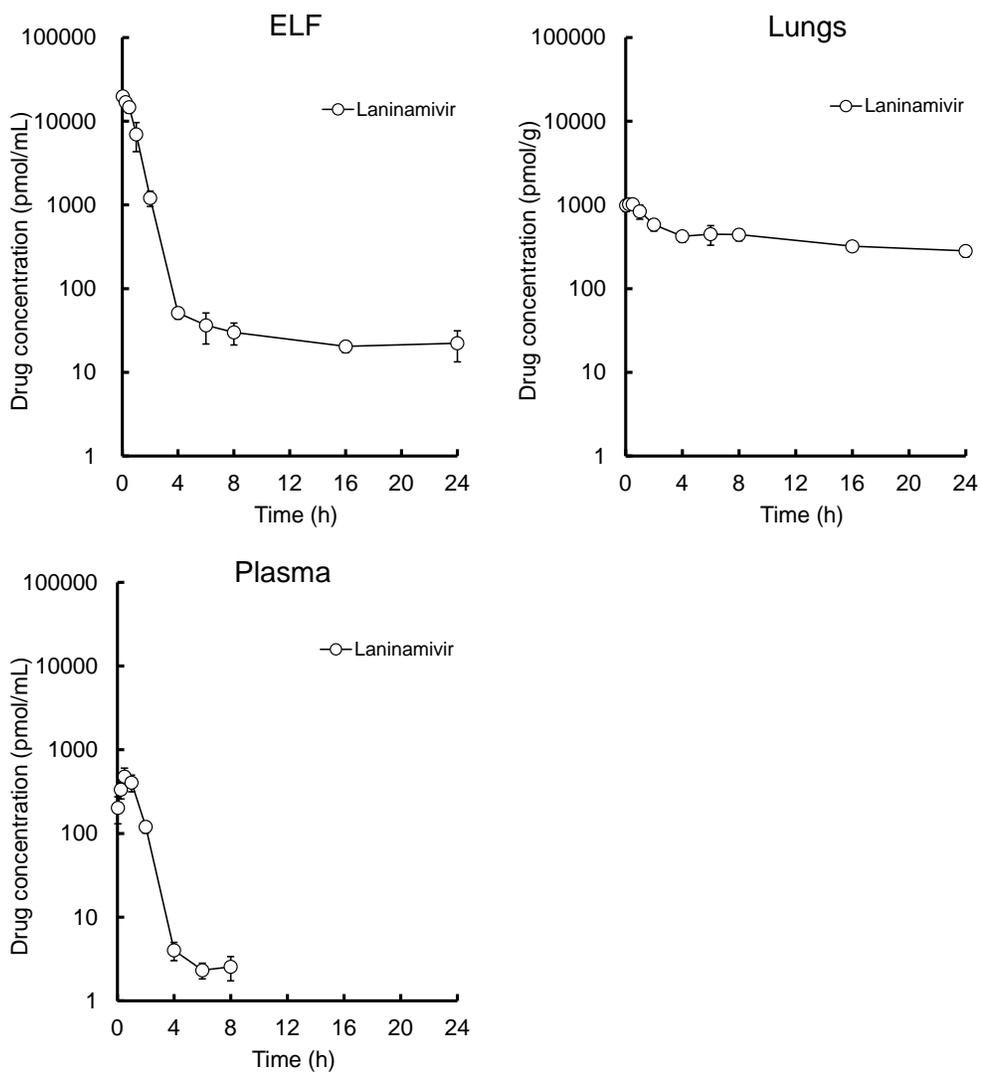


Fig. 4.2 Drug concentration-time profiles in ELF, lungs, and plasma after a single intranasal administration of laninamivir ( $0.5 \mu\text{mol/kg}$ ) to mice

The symbols and vertical bars represent the mean $\pm$ SD of three or four animals at each time point.

Table 4.1 Pharmacokinetic parameters of LO and/or laninamivir in ELF, lungs, and plasma after a single intranasal administration of LO and laninamivir (0.5  $\mu\text{mol/kg}$ ) to mice

Test compound	Matrix	Analyte	$C_{\text{max}}$ ( $\text{pmol/mL}$ or g)	$T_{\text{max}}$ (h)	$T_{1/2}$ (h)	$AUC_{\text{last}}$ ( $\text{pmol}\cdot\text{h/mL}$ or g)
LO	ELF	LO	20400**	0.033*	1.1	23600
		laninamivir	1520	1	25.1	26500
	Lungs	LO	1760	0.5	1.3	4480
		laninamivir	4350	6	30.9	75800
	Plasma	LO	242	0.5	0.6	323
		laninamivir	181	1	13.1	445
Laninamivir	ELF	laninamivir	19900**	0.033*	25.4	19600
	Lungs	laninamivir	1020	0.25	25.0	9890
	Plasma	laninamivir	478	0.5	NC	782

NC, not calculated.

\* initial sampling point, \*\* drug concentration at the initial sampling point.

Each value was calculated based on the mean concentration derived from three or four animals at each time point.

### 4.3 ミクロオートラジオグラフィー

気道組織中における薬物の局在性を明らかにするため、マウスに $[^{14}\text{C}]\text{LO}$ を単回経鼻投与した後、ミクロオートラジオグラフィーにより放射能の分布を細胞レベルで検討した。代表例として投与後 24 h における気管支組織および肺組織のミクロオートラジオグラムを Fig. 4.3 に示す。気管支組織切片では、放射能は主として上皮細胞（線毛円柱上皮細胞および杯細胞）に存在しており、気管支腺にもある程度の存在が認められた。一方、肺組織切片では、細気管支、終末細気管支、呼吸細気管支などに存在する上皮細胞（立方上皮細胞）に放射能が存在しているとともに、肺胞や肺動脈血中にもわずかに認められた。ここで、2.4 項に示したように、投与後 24 h における気道組織には laninamivir のみが存在していることから、Fig. 4.3 の組織切片上で観察された放射能は laninamivir として存在していると考えられた。以上より、laninamivir は気道の上皮細胞に沿って広く分布しており、この細胞が LO 投与後における laninamivir の高い貯留性に重要な役割を果たしていると考えられる。

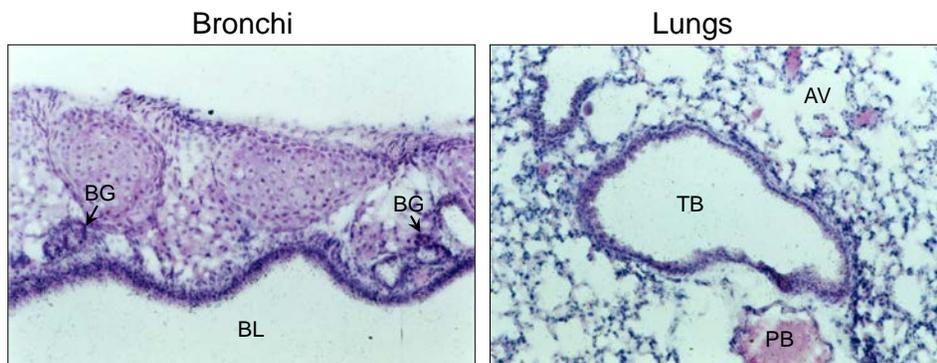


Fig. 4.3 Microautoradiograms of respiratory tissues at 24 h after a single intranasal administration of [ $^{14}\text{C}$ ]LO to mice

Bronchi and lungs are shown as representatives for the respiratory tissues. The distribution of radioactivity is observed on the tissue sections as black dots after magnification (200 $\times$ ) by microscopy. BG, bronchial gland; BL, bronchial lumen; TB, terminal bronchiole; AV, alveoli; PB, pulmonary arterial blood.

#### 4.4 初代培養気道上皮細胞への薬物取り込み

4.2 項および 4.3 項より、laninamivir は気道組織のなかでも上皮細胞に局在していることが示された。そこで、気道上皮細胞における薬物の貯留性を *in vitro* で評価することを目的に、既報を参考にしながら<sup>63)</sup>、マウス肺から気道上皮細胞を単離して初代培養を試みた。その結果、単離した細胞は培養によって上皮細胞様の単層を形成し (Fig. 4.4A)、さらに上皮細胞での発現が知られている pan-cytokeratin<sup>64)</sup>の抗体によって染色されたことから (Fig. 4.4B)、上皮細胞としての形質を有していると判断した。

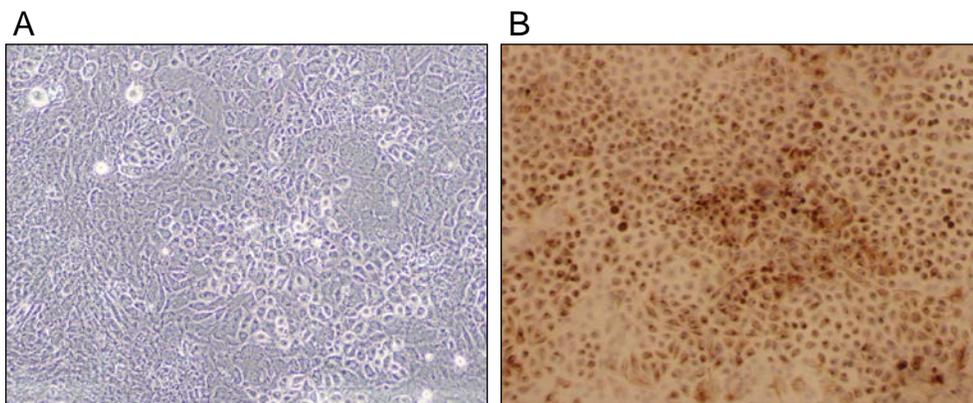


Fig. 4.4 Optical micrograph of primary cultured mouse airway epithelial cells (A) and its immunohistochemical staining with anti-pan-cytokeratin antibody (B)

この初代培養気道上皮細胞を用いて、LO の細胞取り込みの経時推移ならびに濃度依存性について検討した (Fig. 4.5)。その結果、LO (50  $\mu\text{M}$ ) の細胞取り込みはインキュベーション時間に伴って 90 min まで増加した後、ほぼ定常状態に達した。また、活性代謝物である laninamivir の生成も 90 min までほぼ線形であった (Fig. 4.5 A)。これを基に、60 min のインキュベーション時間で、LO (10~1000  $\mu\text{M}$ ) の細胞取り込みの濃度依存性を検討した結果、最高濃度の 1000  $\mu\text{M}$  においても取り込みの飽和はほとんど認められなかったことから (Fig. 4.5 B)、取り込み過程には主に受動輸送が関与し、トランスポーターの関与は無いと考えられた。さらに、細胞内における加水分解にも飽和が無かったことから、LO の加水分解に関与するエステラーゼは高い触媒能を有していると考えられた。

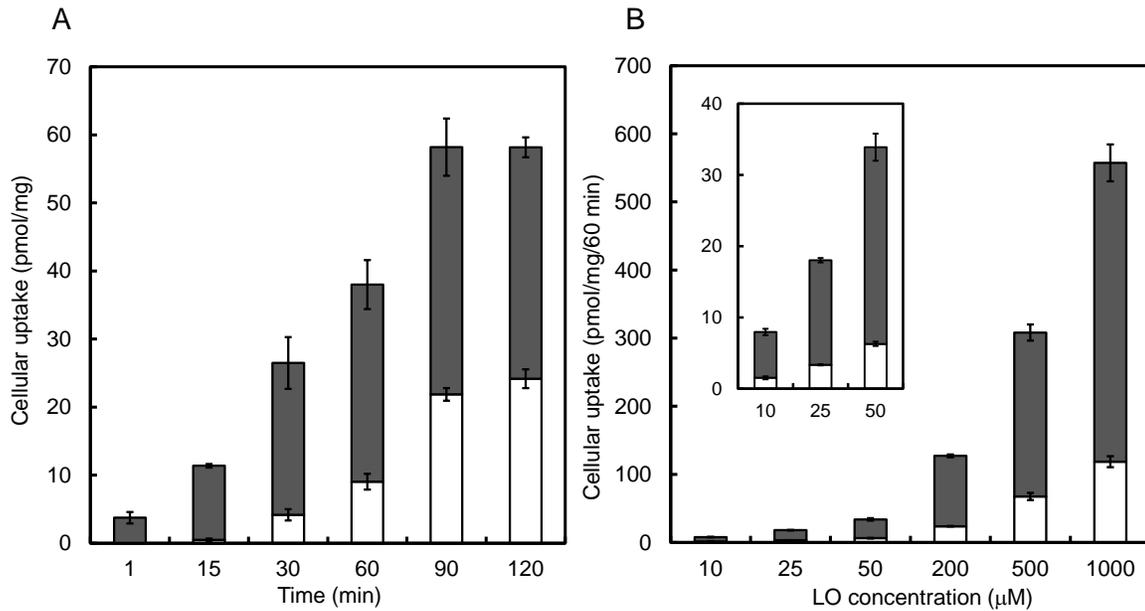


Fig. 4.5 Time course (A) and concentration dependency (B) of LO uptake into primary cultured mouse airway epithelial cells

Cells were incubated at 37°C with 50  $\mu\text{M}$  LO up to 120 min for time course (A) and with 10–1000  $\mu\text{M}$  LO for 60 min for concentration dependency (B), and then intracellular concentrations of LO (closed bar) and laninamivir (open bar) were determined. Data represent the mean $\pm$ SE in triplicate at each point.

#### 4.5 初代培養気道上皮細胞からの薬物放出

細胞内に取り込まれた薬物の細胞外への放出挙動を検討するため、初代培養気道上皮細胞を LO (50  $\mu\text{M}$ ) 存在下で 60 min インキュベート後、薬物非添加培地でさらにインキュベートして培地中および細胞内の薬物濃度を測定した (Fig. 4.6)。その結果、薬物非添加培地によるインキュ

バージョン初期では、細胞内の LO が主として培地中へと放出されるとともに、一部は細胞内で加水分解され、細胞内 laninamivir 濃度は 1 h 後まで上昇した。また、細胞内で生成した laninamivir は培地中への放出が非常に遅く、24 h 後でも細胞内に残存していた。

次いで、取り込まれた LO の細胞内における挙動を把握するため、Fig. 4.7 に示すコンパートメントモデルを用いて、各過程における速度定数を推定した。推定した速度定数を Table 4.2 に、コンパートメントモデルに当てはめた推定薬物濃度推移を Fig. 4.6 の曲線（実線: LO、破線: laninamivir）で示す。細胞内における LO 加水分解の速度定数 ( $k_{\text{Hydrolysis}}$ ) は  $0.561 \text{ h}^{-1}$  であり、これは LO の細胞外放出速度定数 ( $k_{\text{LO}}$ ) に比べてわずかに小さく、laninamivir の細胞外放出速度定数 ( $k_{\text{Lani}}$ ) よりも非常に大きい値であった。このことは、laninamivir の高い細胞内貯留の律速過程が LO の加水分解ではなく細胞外への放出であることを示している。さらに  $k_{\text{Lani}}$  の推定値 ( $0.0707 \text{ h}^{-1}$ ) は、LO 単回経鼻投与後の肺組織中における laninamivir の  $t_{1/2}$  (30.9 h, Table 4.1) から求めた消失速度定数 ( $0.0224 \text{ h}^{-1}$ ) に近いことから、*in vivo* で認められた現象を良く反映していると考えられる。

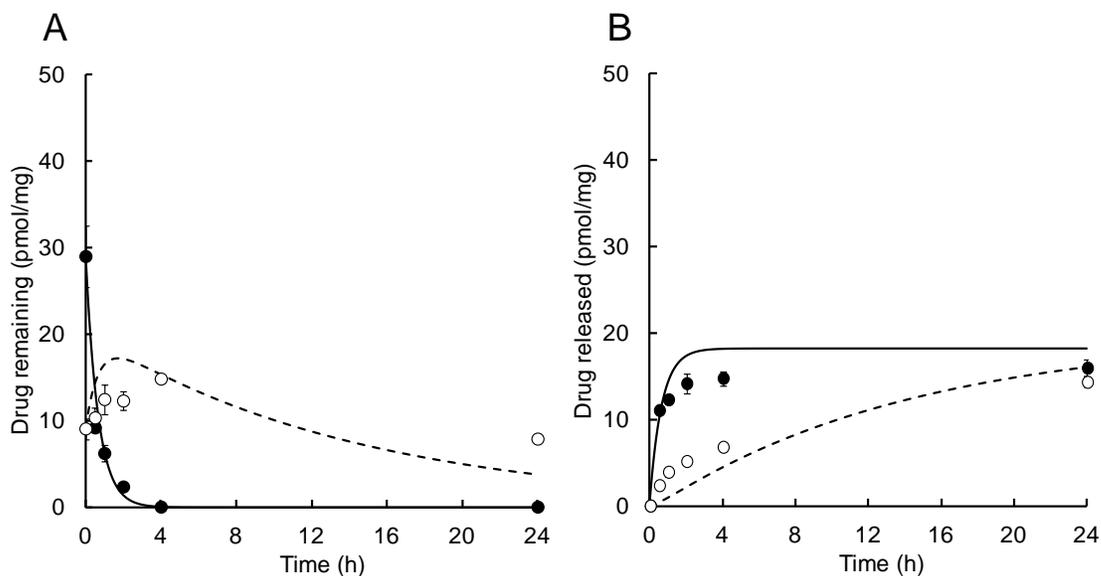


Fig. 4.6 Drug release and disposition in primary cultured mouse airway epithelial cells pre-exposed with LO

Cells were incubated in drug-free medium up to 24 h after being pre-exposed with  $50 \mu\text{M}$  LO for 60 min, and then LO (closed circle) and laninamivir (open circle) in the cells (A) and medium (B) were determined at each time point (mean $\pm$ SE in triplicate). Lines represent the computer-generated best fit of the equations describing the compartmental model (Fig. 4.7) to the data.

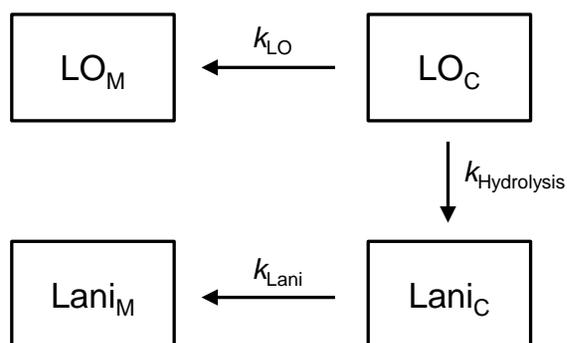


Fig. 4.7 Model scheme depicting drug release and disposition in primary cultured mouse airway epithelial cells pre-exposed with LO

$k_{LO}$ , rate constant of the release of LO into extracellular compartment;  $k_{Hydrolysis}$ , rate constant of the hydrolysis of LO to laninamivir within intracellular compartment;  $k_{Lani}$ , rate constant of the release of laninamivir into extracellular compartment.

Table 4.2 Kinetic parameters associated with drug release and disposition in primary cultured mouse airway epithelial cells

Parameter	Estimate (h <sup>-1</sup> )	SD (h <sup>-1</sup> )	CV (%)
$k_{LO}$	0.950	0.148	15.5
$k_{Hydrolysis}$	0.561	0.107	19.0
$k_{Lani}$	0.0707	0.0177	25.1

Primary cultured mouse airway epithelial cells were incubated with LO (50  $\mu$ M) for 60 min, followed by drug-free medium for up to 24 h. Parameter estimates were generated by nonlinear regression of the data based on the model scheme shown in Fig. 4.7.

#### 4.6 気道貯留メカニズム

以上の結果から、LOのマウス経鼻投与後に認められる活性代謝物 laninamivir の気道貯留メカニズムは、以下の3つのステップにより説明できると考えられる。第1ステップは、LOの気道空間から気道上皮細胞への取り込みである。一般に、吸入された薬剤は受動拡散により気道空間から循環血へと吸収され、その吸収速度は薬剤の脂溶性とともに増大する<sup>65), 66)</sup>。また、脂溶性薬剤の吸収は主として経細胞輸送によると考えられる一方<sup>67)</sup>、水溶性薬剤の場合には細胞間隙を介した受動拡散によって吸収されると考えられている<sup>68)</sup>。前述の通り、LOは活性体である laninamivir にオクタン酸エステルを導入したプロドラッグであり、このため laninamivir に比べて脂溶性が増大している (LO および laninamivir の  $\log D_{7.4}$  は、それぞれ -0.01 および  $< -2.18$ )。従っ

て、LO は laninamivir に比べて細胞膜透過性に優れており、気道上皮細胞への取り込みが高いと考えられる。実際、Fig. 4.1 および Fig. 4.2 に示すように、LO 投与では気道空間から肺組織への輸送を介して薬物が循環血中に吸収されているのに対し、laninamivir 投与の場合には肺中薬物濃度がほとんど増加しないまま ELF 中薬物濃度が速やかに消失していることから、主として細胞間隙を介して気道空間から循環血中へと吸収されていると推察される。

第2ステップは、気道上皮細胞内に存在するエステラーゼによる LO の加水分解である。プロドラッグでは、加水分解が薬理作用の発現や持続時間に大きな影響を及ぼす。LO の場合には、気道組織における加水分解が *in vivo* (Fig. 4.1) および *in vitro* (Fig. 4.5) とともに確認されており、さらに気道上皮細胞内に LO が取り込まれた後も持続的に加水分解を受けることから (Fig. 4.6)、薬理効果の発現に十分な laninamivir 濃度が生成していると考えられる。

第3ステップは、加水分解により生成した laninamivir が、低い細胞膜透過性によって細胞内に留まることである。Fig. 4.6 において、細胞内で生成した laninamivir は、24 h 後でも細胞内に存在することが確認されたが、恐らくはその高い水溶性 ( $\log D_{7.4} < -2.18$ ) のために細胞膜透過性に乏しく、結果として細胞外への薬物放出が低いためであると考えられる。

#### 4.7 小括

マウスにおける LO の肺内挙動を *in vivo* および *in vitro* で検討した結果、以下の知見を得た。

- 1) マウスに経鼻投与された LO は速やかに気道空間へと到達した後、気道組織内、なかでも気道上皮細胞に分布した。
- 2) マウスの気道上皮細胞内に取り込まれた LO は、細胞内のエステラーゼにより laninamivir へと変換された。LO の加水分解活性に飽和性はほとんど無く、関与するエステラーゼは高い触媒能を有していると考えられた。
- 3) マウスの気道上皮細胞内で生成した laninamivir は、細胞外への放出が非常に遅いことから、この放出過程が細胞内貯留の律速になっていると推察された。
- 4) これより、気道貯留性は以下の3ステップにより達成されているものと考えられた。
  - ① LO の気道上皮細胞への取り込み
  - ② 細胞内に存在するエステラーゼによる LO の加水分解
  - ③ 生成した laninamivir の高い水溶性による細胞膜透過性の低下

このような気道貯留性を指向したプロドラッグ化の手法は、気道組織を標的とする他の薬剤にも有用である可能性が高いと考えられる。

## 第5章 気道貯留性を指向した吸入剤のプロドラッグ化に関する考察

一般にプロドラッグ化の技術は、薬理活性体が有する問題点の克服、すなわち溶解性や安定性の改善をはじめ、吸収性の向上、標的部位への移行、代謝および排泄の抑制（作用の持続化）、毒性の軽減などを目的に幅広く活用されている<sup>69)</sup>。このうち標的部位への移行を目的としたプロドラッグ化では、特に脳へのターゲティング（chemical delivery system: CDS）を中心にいくつかの事例が報告されている<sup>70)</sup>。例えば、HIV 治療薬 azidothymidine (AZT) のプロドラッグ (AZT-CDS) では、その脂溶性により血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) を通過して脳へと移行した後、酸化代謝と加水分解を受けて AZT が生成するが、この AZT は水溶性のため循環血への移行が抑制されて脳内に貯留することが知られている<sup>71) - 73)</sup>。他にも codeine (methyldorphine)<sup>74), 75)</sup>、L-DOPA<sup>76)</sup>、estredox (estradiol の CDS prodrug)<sup>77), 78)</sup>などが脳へのターゲティングの事例として報告されているほか、肝臓では pradefovir (adefovir の HepDirect<sup>®</sup> prodrug)<sup>79) - 82)</sup>が、腎臓では L- $\gamma$ -glutamyl-L-DOPA<sup>83), 84)</sup>などが報告されている。しかしながら、本研究で示した LO のように、吸入剤などの局所投与製剤を用い、なおかつプロドラッグ化によって気道組織での貯留性を獲得した事例は極めて少ない。そこで本章では、本研究を通じて得た知見をもとに、気道貯留性を指向した吸入剤のプロドラッグ化の可能性と、その際に考慮すべき事項について考察する。

気道貯留性を指向した吸入剤プロドラッグの薬物挙動に関する模式図を Fig. 5.1 に示す。一般に、吸入により気道空間へ到達した薬物は、溶解過程を経たのち（粉末製剤の場合）、経細胞輸送あるいは細胞間隙輸送により気道組織中や循環血中へと移行する。従って、気道組織における薬物の貯留性を向上させるためには、経細胞輸送の初発過程である細胞内取り込みを増加させることが重要となる。細胞内取り込みを増加させる方法としては、アルキル基やアシル基などの脂溶性修飾基を活性体に付加させることにより細胞膜透過性を向上させる方法が考えられる。本研究で示した LO もその一例であり、laninamivir の水酸基に脂溶性修飾基としてオクタン酸エステルを付加することにより細胞膜透過性を獲得している。これに加えて最近では、種々のトランスポーターが気道組織に発現していることが報告されており（Table 5.1）、salbutamol ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体作動薬) や itratropium (ムスカリン受容体拮抗薬) などの吸入薬が気道上皮細胞の頂端膜に発現するトランスポーター (OCT1, OCTN1, OCTN2 など) を介して細胞内に取り込まれることが明らかとなっている<sup>85) - 88)</sup>。従って、このような取り込みトランスポーターへの基質認識性を考慮した化学修飾ができれば、気道組織への薬物輸送を増大させることが可能と考えられる。

一方、細胞間隙輸送は、細胞膜を透過せずに循環血へと薬物が移行するものであるため、気

道貯留性を向上させる目的において、この輸送の寄与は小さいほうが好ましい。一般に、水溶性が高い化合物ほど細胞間隙輸送の寄与は大きいと考えられており<sup>68)</sup>、さらに分子量が 40 kDa 未満の物質は受動拡散によって細胞間隙を透過し<sup>89), 90)</sup>、その透過速度と分子量との間には逆相関の関係が認められるとの報告がある<sup>89-92)</sup>。このことから、細胞間隙輸送に関しては分子サイズを考慮することにより、その寄与をある程度制御できるものと考えられる。その一方で、分子量が 1000 Da 未満の化合物においては、分子量の違いが透過速度に及ぼす影響はごく僅かであるとの報告もあることから<sup>93)</sup>、細胞間隙輸送の評価にあたっては注意が必要と考えられる。

また、細胞内に取り込まれたプロドラッグは、細胞内に存在する代謝酵素により活性体へと変換される必要がある。気道組織に存在する代謝酵素としては、CYP1A1 や CYP3A5 などの P450 分子種、*paraoxonase* や *carboxylesterase* をはじめとする加水分解酵素（以上、Phase I 酵素）、GST や *SULT* のような抱合酵素（Phase II 酵素）など多くの報告があるが（Table 5.2）、このうち活性体の生成に関与できる酵素は、Phase I 酵素のいずれかであると考えられる。Phase I 酵素のうち P450 分子種については、肝臓に比べて肺における発現レベルが比較的低いことが知られている<sup>94)</sup>。また、存在する分子種は両組織間で共通しているものが多いが、一部の分子種（CYP1A1, 1B1, 2A6, 2A13, 2F1, 2S1, 3A5, 3A34, 4B1）については肺選択的に発現しているとの報告がある<sup>95)</sup>。一方、加水分解酵素については肺などの気道組織に焦点を当てた報告がほとんど無いのが現状であるが、もし選択的な酵素が存在していればその酵素を利用することによって気道組織で選択的に活性体を生成させることができるとともに、その他の組織における毒性発現のリスクを低減できる可能性が考えられる。

薬理作用を最大化しながら毒性リスクを最小化するためには、プロドラッグの膜透過速度と活性体の生成速度とのバランスを考慮することも重要と考えられる。活性体の生成速度は、効果の発現までに要する時間や効果の強さに大きく影響を及ぼすと同時に、代謝活性の個人差は効果のバラツキに繋がることから、関与する代謝酵素の選定には多型も含めた個人差を最小限に抑えるようにする必要がある。さらに、プロドラッグの膜透過性が高い場合には、プロドラッグのまま循環血中へと移行するのを回避するため、活性体への代謝速度は大きい方が望ましいと考えられる。また、効率的な活性体生成のためには、活性体生成以外のプロドラッグ代謝の寄与を少なくすることや、活性体のさらなる代謝が少ないことも重要と考えられる。一方、毒性低減の観点からは、気道空間から循環血へ吸収された薬物が他の組織に分布せずに速やかに代謝あるいは排泄されること（低分布容積、高クリアランス）が望ましいとともに、吸入した薬物の一部が嚥下により消化管へと移行することから、経口吸収性は低い方が望ましいと考えられる。

以上より、気道貯留性を指向した局所投与製剤の場合においても、薬物の貯留性を向上させ

る手段としてプロドラッグが有用な場合があると考えられる。プロドラッグは、活性化過程に寄与する酵素の欠損や活性のバラツキの問題などを考慮しなければならないことから、必ずしも簡便な選択肢であるとは限らないが、活性体自身の持つ薬理活性を変化させずに目的とする組織に薬物を到達させる手段の一つとして、今後も有用であると考えられる。また、吸入という投与経路は、薬物を気道中に直接到達させることができるため、喘息、慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症、肺感染症などの呼吸器疾患領域においては、治療薬の投与経路として今後も有効であると考えられる。

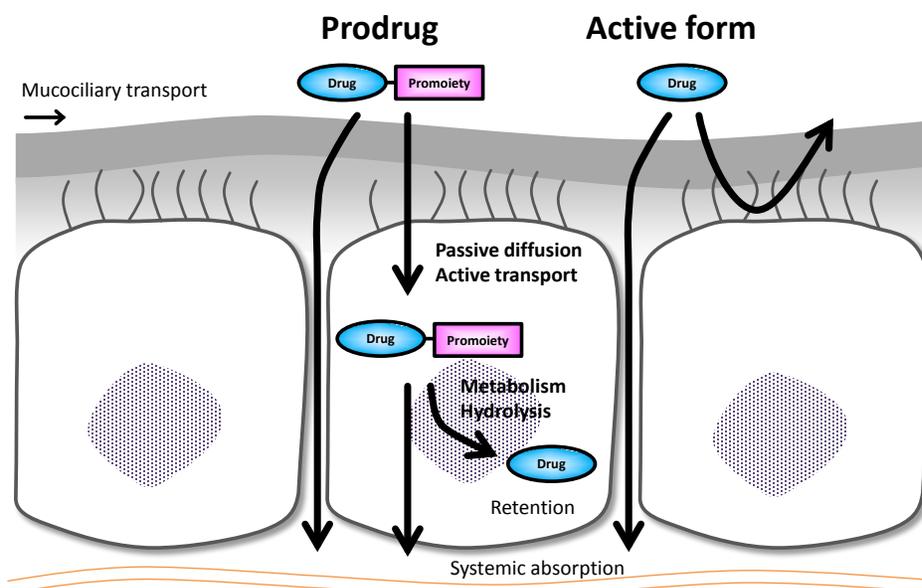


Fig. 5.1 An illustration of prodrug approach toward prolonged airway retention of inhaled drugs

Table 5.1 Major drug transporters expressed in human lungs<sup>96), 97)</sup>

Category	Transporter
SLC transporter	OCT1, OCT2, OCT3 OCTN1, OCTN2 PEPT1, PEPT2 OAT2
SLCO transporter	OATP2B1, OATP3A1, OATP4A1, OATP4C1
ABC transporter	P-gp (MDR1) MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6, MRP7, MRP8, MRP9 BCRP

Table 5.2 Major drug metabolizing enzymes detected in human lungs <sup>95), 98), 99), 100), 101)</sup>

Type	Category	Enzyme
Phase I	Oxidation	CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2A13, 2B6/7, 2C8/18, 2D6, 2E1, 2F1, 2J2, 2S1, 3A4, CYP3A5, 3A43, 4B1 Flavin monooxygenase
	Hydrolysis	Epoxide hydrolase Paraoxonase Carboxylesterase Cholinesterase
Phase II	Conjugation	UGT GST SULT NAT

## 第6章 総括

新規 NA 阻害剤の LO は、活性体 laninamivir にオクタン酸エステルを付加した吸入型プロドラッグであり、インフルエンザ感染症の治療薬として臨床適用されている。インフルエンザウイルスのマウス感染モデルにおいて、類薬である oseltamivir および zanamivir はそれぞれ反復経口投与および反復経鼻投与により抗ウイルス作用を示すのに対し、LO は単回経鼻投与で十分な抗ウイルス作用を示し、さらにインフルエンザウイルスの感染患者においても 1 回の吸入投与により治療効果を発揮する。そこで本研究では、このような効果の持続をもたらす要因やメカニズムを薬物動態の観点から明らかにすることを目的に検討を実施した。実験動物としてはマウスあるいはラットを選択し、標的器官である気道組織（気管および肺）における薬物動態を中心に検討した。気道組織における薬物貯留レベルを比較するため、評価化合物としては LO のほか、laninamivir や zanamivir も適宜加えた。また、*in vitro* ではマウス気道組織の細胞画分における LO の加水分解についても検討した。さらに、マウス気道上皮細胞の初代培養系を用いて、細胞内における LO の薬物挙動を調べることにより、効果の持続をもたらすメカニズムについても検討した。以下に本研究で得られた知見を総括する。

- 1) マウスに LO を単回経鼻投与後、LO は気道組織に存在する加水分解酵素（カルボキシルエステラーゼやコリンエステラーゼと推定）により laninamivir へと効率良く変換され、laninamivir 以外の代謝物は気道組織に検出されなかった。気道組織における laninamivir は長時間にわたって貯留し、投与後 24 h における気管中および肺中 laninamivir 濃度は、LO の単回経鼻投与の方が laninamivir の単回経鼻投与に比べて 10 倍程度高かったことから、プロドラッグ化により望ましい貯留特性を獲得していることが明らかとなった。さらに、この貯留性は zanamivir の単回経鼻投与よりも 10 倍程度高く、なおかつ *in vitro* における laninamivir の IC<sub>50</sub> 値よりも十分に高い濃度を維持していたことから、LO 投与で認められる抗ウイルス作用の持続の要因として、この高い気道貯留性が考えられた。（第 2 章）
- 2) ラットの LO 単回経気管投与でも、マウスの場合と同様に、気道組織における LO の加水分解と、それに続く laninamivir の高い貯留性が認められた。この時の血漿中における laninamivir の t<sub>1/2</sub> (14.1 h) は、laninamivir の単回静脈内投与時の t<sub>1/2</sub> (0.5 h) に比べて非常に長く、この差異は気道組織に存在する laninamivir が循環血中へと吸収される過程が律速 (flip-flop 現象) となることによって生じているものと考えられた。さらに、循環血へと徐々に吸収された laninamivir は、さらなる代謝を受けることなく主として尿中へと排泄され、その排泄は糸球

体濾過によると考えられた。これより、気道組織における薬物濃度の評価が困難なヒトにおいても、血漿中の薬物動態あるいは尿中への薬物排泄挙動から間接的に laninamivir の気道貯留性を推測できると考えられた。(第3章)

- 3) マウスの LO 単回経鼻投与後に生成する laninamivir は、ELF 中だけでなく、気道組織中にも高い濃度で存在し、中でも気道上皮細胞に局在していることが判明した。初代培養したマウス気道上皮細胞において、LO の細胞内取り込みは経時的に増加し、その取り込みには濃度飽和性が認められなかったことから、取り込み過程には主に受動輸送が関与し、トランスポーターの関与は無いと考えられた。また、細胞内に取り込まれた LO は加水分解を受けて laninamivir に変換し、この加水分解活性にも飽和性が認められなかったことから、関与する加水分解酵素は高い触媒能を有していると考えられた。さらに、細胞内からの laninamivir 放出速度定数 ( $0.0707 \text{ h}^{-1}$ ) は、細胞内における LO 加水分解速度定数 ( $0.561 \text{ h}^{-1}$ ) や細胞内からの LO 放出速度定数 ( $0.950 \text{ h}^{-1}$ ) に比べて非常に小さいことから、この放出過程が細胞内での laninamivir 貯留の律速になっていると推察された。(第4章)
- 4) これら *in vivo* および *in vitro* における検討結果より、LO の気道貯留メカニズムは以下に示す3つのステップから成り立っていると考えられた。①経鼻投与あるいは経気管投与後において、LO が気道空間から気道上皮細胞内へと取り込まれる。②気道上皮細胞内に存在する加水分解酵素により LO が加水分解を受け、活性体 laninamivir が生成する。③細胞内で生成した laninamivir は、高い水溶性のために細胞膜の透過性が低く、その結果として細胞内に高い濃度で長時間にわたって維持される。(第4章)
- 5) 一般に、気道に到達した薬物の吸収過程には経細胞輸送および細胞間隙輸送が関与し、両者の寄与の度合いは薬物の脂溶性や分子サイズなどによって異なることが知られている。薬理作用を最大化しながらも毒性リスクを最小化するためには、これらのことに留意してプロドラッグ設計することが望ましいと考えられる。また、近年では動物の肺だけでなく、ヒトの肺においても各種トランスポーターの発現に関する報告をはじめ、加水分解酵素やチロクローム P450 などの代謝酵素の発現に関する報告がある。従って、気道組織をターゲットにしたプロドラッグの分子設計にあたっては、これらトランスポーターや代謝酵素に対する薬物の認識性や種差、さらには個人間のバラツキを考慮する必要があると考えられる。(第5章)

以上のように、本研究では LO 投与によって抗ウイルス作用が持続する要因を薬物動態の観点から明らかにするとともに、そのメカニズムの一端も明らかにした。現在上市されているプロドラッグは経口剤が多く、このため加水分解をはじめとする代謝研究は小腸や肝臓が中心であり、肺などの気道組織における代謝研究の報告はごく僅かである。本研究で用いた LO は、気道組織に存在する加水分解酵素を利用した吸入型プロドラッグの一例となるものであり、しかも気道組織における高い貯留性を指向したものであることから、気道組織における薬理作用の持続性を向上させるという点においてプロドラッグの新たな可能性を示すものである。このようなアプローチによるプロドラッグ化は、インフルエンザ治療薬のみならず、喘息、慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症などの呼吸器疾患領域の治療薬を開発する上においても、標的器官での薬物貯留性を向上させる 1 つの手段となることが期待される。

## 実験の部

### 第2章に関する実験の部

#### 1) 試薬

[<sup>14</sup>C]LO (20.8 mCi/mmol)、[<sup>14</sup>C]laninamivir (14.9 mCi/mmol)、および[<sup>14</sup>C]zanamivir (19.0 mCi/mmol) は GE Healthcare UK Limited で合成した。非標識体の LO および laninamivir<sup>102)</sup>、それらの内部標準物質である[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]LO および[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]laninamivir は第一三共(株)で合成し、zanamivir も第一三共(株)で合成した。DFP、BNPP、PCMB は、それぞれ EMD Chemicals Inc.、東京化成工業(株)、フナコシ(株)から購入した。Eserine、DTNB、EDTA は Sigma-Aldrich Co.から購入した。その他の一般試薬および溶媒は、特級、一級、HPLC 用あるいは LC/MS 用相当を用いた。

#### 2) 動物

雌性 BALB/c マウスは日本チャールス・リバー(株)から 6 週齢で購入し、1 週間の馴化後に実験に供した。固形試料 (FR-2、(株)船橋農場) および水道水は、投与時を除いて自由摂取させた。

#### 3) 投与

各化合物 ([<sup>14</sup>C]LO、LO、[<sup>14</sup>C]laninamivir、[<sup>14</sup>C]zanamivir) は生理食塩液に 0.2 μmol/mL の濃度で溶解させ、ジエチルエーテルおよびクロロホルムの 1:1 混液による麻酔下において、マウスに 2.5 mL/kg の投与液量 (投与量として 0.5 μmol/kg に相当) で経鼻投与した。但し、気管および肺中代謝物の同定においては、検出感度を考慮して投与液濃度を 1.2 μmol/mL とした (投与量として 3 μmol/kg に相当)。

#### 4) 全身オートラジオグラフィー

マウスに[<sup>14</sup>C]LO、[<sup>14</sup>C]laninamivir、および[<sup>14</sup>C]zanamivir (いずれも 0.5 μmol/kg) を単回経鼻投与し、0.25, 1, 6, 24, 48, 72, 168 h 後にジエチルエーテルの深麻酔により安楽死させた (N=1/時点)。屠体をアセトン-ドライアイス液中で凍結した後、4% (w/v) カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液中に包埋し、包埋したブロックを再度アセトン-ドライアイス液中で凍結した。次いで、Cryomacrocut (CM3600; Leica Microsystems Nussloch GmbH) を用いて、凍結ブロックを-25°C 下でスライスし、厚さ 30 μm の凍結切片を作製した。これを凍結乾燥した後 (-25°C、48-72 h)、乾燥切片を保護膜で被い、イメージングプレート (BAS-MS2040、富士フイルム(株)) に密着し、シールドボックス内で 24 h 露出した。露出後、イメージングプレート上に記録された放射能像をバ

イオイメージングアナライザーシステム (Fujix-BAS2500、富士フイルム株) を用いて読み取り、全身オートラジオグラムを作製した。以下に読み取り条件を示す。

読み取り分解能 (Resolution)	: 50 mm
階調 (Gradation)	: 256
読み取り感度 (Sensitivity)	: 10,000
収録範囲 (Latitude)	: 4

なお、 $[^{14}\text{C}]\text{LO}$ 、 $[^{14}\text{C}]\text{laninamivir}$ 、および $[^{14}\text{C}]\text{zanamivir}$  の投与液は、投与放射能が同一 (6.76  $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ ) になるように非標識体を用いて適宜調整した。

#### 5) 気管および肺中放射能濃度の定量

マウスに $[^{14}\text{C}]\text{LO}$ 、 $[^{14}\text{C}]\text{laninamivir}$ 、および $[^{14}\text{C}]\text{zanamivir}$  (いずれも 0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) を単回経鼻投与し、0.25, 1, 6, 24 h 後にジエチルエーテル麻酔下で放血致死させた (N=3/時点)。屠体から気管および肺全体を採取し、それらの湿重量を測定した後、組織溶解剤 NCS-II (Amersham International plc, 1.5 mL) を添加して 50°C で振倒しながら組織を溶解した。溶解後の試料を Hionic-Fluor (Perkin-Elmer, Inc., 10 mL) と混合し、液体シンチレーションカウンター Model 2300TR (Packard Instrument Company) で放射能を測定した。組織中放射能濃度は  $^{14}\text{C}$  標識体相当量として算出し、組織 1 g 当りの濃度 (nmol eq./g) として表記した。

#### 6) 気管および肺中代謝物の同定

マウスに $[^{14}\text{C}]\text{LO}$  (3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) を単回経鼻投与し、1 および 24 h 後にジエチルエーテル麻酔下で放血致死させた (N=25/時点)。屠体から気管および肺全体を採取し、組織毎にプールした後、湿重量を測定した。湿重量に対して 3 倍量のエタノールを添加し、ポリトロンホモジナイザー PT10/35 (Kinematica AG) を用いて各組織を氷中でホモジネートした。このホモジネート試料を遠心した後 (18,800 g, 4°C, 3 min)、上清に抽出されたフラクションを放射能検出器 Radiomatic 500TR (Perkin-Elmer, Inc.) および質量分析計 Q-ToF Ultima (Waters Corp.) を装着させた HPLC システム (Alliance 2695 separation module, 2996 photodiode array detector; Waters Corp.) にて分析し、代謝物の化学構造を同定した。以下に分析条件を示す。

## HPLC 条件

システム	: Alliance 2695 separations module, 2996 photodiode array detector (Waters Corp.)
カラム	: Hydrosphere C18 (5 $\mu$ m, 6.0 $\times$ 150 mm; YMC Co., Ltd.)
カラム温度	: 30°C
移動相	: A, 0.1% (v/v) CH <sub>3</sub> COOH in H <sub>2</sub> O B, 0.1% (v/v) CH <sub>3</sub> COOH in CH <sub>3</sub> CN
グラジエント	: Time (min), 0 $\rightarrow$ 5.0 $\rightarrow$ 25.0 $\rightarrow$ 26.0 $\rightarrow$ 30.0 B (%), 0 $\rightarrow$ 0 $\rightarrow$ 50 $\rightarrow$ 80 $\rightarrow$ 80
流速	: 1 mL/min
注入量	: 10 あるいは 40 $\mu$ L

## 放射能検出条件

放射能検出器	: Radiomatic 500TR (Perkin-Elmer, Inc.)
セル容量	: 0.5 mL
シンチレーションカクテル	: Ultima-Flo M (PerkinElmer, Inc.)
流速	: 3.0 mL/min

## 質量分析条件

システム	: Q-Tof Ultima (Waters Corp.)
イオン化モード	: ESI-positive
Capillary 電圧	: 3 kV
Cone 電圧	: 35 V
Collision energy	: 10 eV (LC-MS 測定) あるいは 25 eV (LC-MS/MS 測定)

## 7) 肺中薬物濃度推移

マウスに LO (0.5  $\mu$ mol/kg) を単回経鼻投与し、0.25, 1, 3, 6, 24, 48, 72, 120 h 後にジエチルエーテル麻酔下で放血致死させた (N=3-4/時点)。屠体から肺全体を採取して湿重量を測定した。湿重量に対して 9 倍量の CH<sub>3</sub>CN-5% CH<sub>3</sub>COOH (1/1, v/v) 溶液を添加し、ポリトロンホモジナイザーPT-MR3000 (Kinematica AG) を用いて氷中でホモジネートした。このホモジネート試料を遠心した後 (18,800 g, 4°C, 3 min)、上清を固相抽出操作に供した。初めに、0.1 mL のホモジネート

上清を 0.65 mL の H<sub>2</sub>O と混合し、これを予め CH<sub>3</sub>OH と H<sub>2</sub>O で活性化しておいた Oasis HLB 96-well plate (30 mg/well, 30 µg; Waters Corp.) に添加した。ここで得られたプレート素通り液は、別途 laninamivir の抽出操作に供するために回収した。次いで、プレートを 1 mL の CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (1/19, v/v) で 2 回洗浄した後、0.2 mL の CH<sub>3</sub>OH で溶出した。この溶出液を 0.2 mL の H<sub>2</sub>O で希釈し、これを LO の測定試料とした。一方、先に回収したプレート素通り液は 0.5 mL の CH<sub>3</sub>CN と混合し、予め CH<sub>3</sub>OH と 0.3% CH<sub>3</sub>COOH で活性化しておいた VersaPlate 96-well Certify plate (100 mg/well, 40 µg; Varian, Inc.) に添加した。このプレートを 1 mL の CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) で 2 回洗浄した後、0.4 mL の CH<sub>3</sub>OH-2% ammonium hydroxide (1/1, v/v) で溶出した。この溶出液を 0.15 mL の CH<sub>3</sub>OH-25% CH<sub>3</sub>COOH (1/1, v/v) と混合し、これを laninamivir の測定試料とした。分析には、API5000 (Applied Biosystems/MDS SCIEX) および Nanospace SI-2 (Shiseido Co., Ltd.) から成る LC-MS/MS システムを使用した。また、内部標準物質には [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]LO および [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]laninamivir を使用した。以下に LO および laninamivir の分析条件を示す。

#### LO の HPLC 条件

システム	: Nanospace SI-2 (Shiseido Co., Ltd.)
カラム	: Shim-pack XR-ODS (2.2 µm, 2.0×100 mm; Shimadzu Corp.)
カラム温度	: 60°C
移動相	: A, CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (950/50, v/v) B, CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (50/950, v/v)
グラジエント	: Time (min), 0 → 2.0 → 3.0 → 3.1 → 7.0 B (%), 100 → 10 → 10 → 100 → 100
流速	: 0.2 mL/min
注入量	: 5 µL

#### LO の MS/MS 条件

システム	: API5000 (Applied Biosystems/MDS SCIEX)
イオン化モード	: ESI-positive
Curtain gas	: N <sub>2</sub> , 20 (psi)
Collision gas	: N <sub>2</sub> , 7 (arbitrary unit)
Ion source gas 1	: Air, 40 (psi)
Ion source gas 2	: Air, 50 (psi)
Ionspray 電圧	: 5000 V

Ion source 温度 : 700°C

Interface heater : on

	Multiple reaction monitoring condition	Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Collision cell exit potential (V)
LO	$m/z$ 473 → $m/z$ 179	90	35	18
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]LO	$m/z$ 476 → $m/z$ 179	90	35	14

#### Laninamivir の HPLC 条件

システム : Nanospace SI-2 (Shiseido Co., Ltd.)

カラム : Atlantis HILIC Silica (5 μm, 2.1 × 150 mm; Waters Corp.)

カラム温度 : 40°C

移動相 : A, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (950/50, v/v)  
B, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (50/950, v/v)

グラジエント : Time (min), 0 → 3.0 → 5.0 → 5.1 → 8.0  
B (%), 0 → 80 → 80 → 0 → 0

流速 : 0.2 mL/min

注入量 : 5 μL

#### Laninamivir の MS/MS 条件

システム : API5000 (Applied Biosystems/MDS SCIEX)

イオン化モード : ESI-positive

Curtain gas : N<sub>2</sub>, 20 (psi)

Collision gas : N<sub>2</sub>, 6 (arbitrary unit)

Ion source gas 1 : Air, 50 (psi)

Ion source gas 2 : Air, 60 (psi)

Ionspray 電圧 : 4500 V

Ion source 温度 : 700°C

Interface heater : off

	Multiple reaction monitoring condition	Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Collision cell exit potential (V)
Laninamivir	$m/z$ 347 → $m/z$ 121	60	40	22
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]Laninamivir	$m/z$ 350 → $m/z$ 121	60	40	22

## 8) 薬物動態パラメータの算出

肺中 LO および laninamivir 濃度推移から薬物動態パラメータ ( $C_{\max}$ ,  $t_{\max}$ ,  $t_{1/2}$ ) を算出した。算出には WinNonlin Professional (version 4.0.1; Pharsight Corp.) を、モデルは noncompartment model を使用した。なお、 $C_{\max}$  および  $t_{\max}$  は実測値から求め、 $t_{1/2}$  は消失相における 3 点以上の測定値を用いた片対数回帰分析により算出した。

## 9) 気管および肺 S9 の調製

ジエチルエーテル麻酔下で放血致死させたマウス 50 匹から気管および肺を採取し、それらを組織毎にプールした。湿重量に対して 3 倍量の 0.15 M KCl 含有 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を添加し、ポリトロンホモジナイザーPT-MR3000 を用いて各組織を氷中でホモジネートした。このホモジネート試料を 4°C にて 9,000 g で 15 min 遠心分離し、回収した上清を S9 とした。調製した S9 の蛋白濃度は、Lowry 法により BSA を標準蛋白質として測定した。なお、調製した S9 は液体窒素で瞬間凍結させた後、実験に供するまで -80°C で保存した。

## 10) 気管および肺 S9 における LO の加水分解

気管および肺 S9 を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 2 mg/mL の蛋白濃度になるように希釈し、その希釈液を 37°C で 10 min プレインキュベートした。次いで、LO (終濃度 10  $\mu$ M) を添加して加水分解反応を開始し、所定の時間に等量の  $\text{CH}_3\text{CN}$  を反応液に加えて反応を停止した。4°C にて 18,800 g で 3 min 遠心した後、上清を laninamivir 濃度の測定に供した (測定条件は上記 7 と同一)。さらに、エステラーゼ阻害剤の加水分解に及ぼす影響を検討するため、DFP、eserine、BNPP、EDTA、DTNB、PCMB (終濃度 1 mM) を S9 に添加して 10 min プレインキュベートした後、LO (終濃度 10  $\mu$ M) の加水分解反応を行った (但し、気管 S9 については DFP 添加のみ実施)。なお、この実験は 1% dimethyl sulfoxide の存在下で実施し、得られた結果はコントロールの加水分解活性に対する割合 (%) で表示した。

## 第3章に関する実験の部

### 1) 試薬

LO および laninamivir は第一三共(株)で合成し<sup>102), 103)</sup>、それらの内部標準物質である $[^2\text{H}_3]\text{LO}$  および $[^2\text{H}_3]\text{laninamivir}$  も同様に第一三共(株)で合成した。 $[^{14}\text{C}]\text{LO}$  (40.4  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ) および $[^{14}\text{C}]\text{laninamivir}$  (34.0  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ) は GE Healthcare UK Limited で合成した。その他の一般試薬および溶媒は、特級、一級、あるいは LC/MS 用相当を用いた。

### 2) 動物

雄性 Sprague-Dawley ラットは日本チャールス・リバー(株)から7週齢で購入し1週間の馴化後に実験に供した。固形試料 (FR-2) および水道水は自由摂取させた。但し、投与前夜から投与後7時間までは絶食させた。

### 3) 投与

投与液は、各化合物 (LO、 $[^{14}\text{C}]\text{LO}$ 、laninamivir、 $[^{14}\text{C}]\text{laninamivir}$ ) を生理食塩液に溶解させることにより調製した。経気管投与では、ペントバルビタール麻酔下で切開して気管を露出させた後、ポリエチレンチューブ (株夏目製作所) を接続したマイクロシリンジを用いて、投与液を気管内に直接投与した。一方、静脈内投与では、注射針付きシリンジを用いて尾静脈より投与液を投与した。投与液量は、経気管投与および静脈内投与においてそれぞれ 0.8 および 1 mL/kg とした。なお、投与量を含む実験条件については、以下に示す各項目に明記した。

### 4) 組織分布

ラットに $[^{14}\text{C}]\text{LO}$  (0.5 mg/kg) を単回経気管投与し、0.25, 0.5, 1, 3, 6, 24, 48 h 後にジエチルエーテル麻酔下で腹部大動脈より血液を採取して放血致死させ、次いで気管および肺を含む 19 組織を採取した (N=3~4/時点)。血液および血漿 (遠心により調製、各 0.1 mL) は、それぞれ組織溶解剤 NCS-II (1.5 mL) と混合した。肺については、組織全体を摘出して湿重量を測定した後、湿重量に対して 4 倍量のエタノールを添加してポリトロンホモジナイザー PT10/35 を用いて水中でホモジネートした。次いで、肺ホモジネートの一部を秤量し、NCS-II (1.5 mL) を添加して 50°C で振倒しながら組織を溶解した。肺以外の組織については、小片 (湿重量として 0.5 g 未満) を採取し、NCS-II (1.5 mL) を添加して 50°C で振倒しながら溶解した。なお、血液および着色組織 (肝臓など) に対しては、NCS-II の添加前に 30% 過酸化水素水 (0.1 mL) を添加して脱色を行った。溶解後の試料は、Hionic-Fluor (10 mL) と混合し、液体シンチレーションカウンター Model

2300TR で放射能を測定した。放射能濃度は  $^{14}\text{C}$  標識体相当量として算出し、1 mL あるいは 1 g 当りの濃度 ( $\mu\text{g eq./mL}$  あるいは  $\mu\text{g eq./g}$ ) として表記した。なお、定量下限 (LLOQ) はバックグラウンド放射能の 2 倍に設定し、LLOQ 未満の値は 0 dpm と見なした。

#### 5) 気管および肺中代謝物の同定

ラットに $^{14}\text{C}$ ]LO (0.3 mg/kg) を単回経鼻投与し、1 および 24 h 後にジエチルエーテル麻酔下で放血致死させた (N=4~5/時点)。屠体から気管および肺全体を採取し、組織毎にプールした後、湿重量を測定した。湿重量に対して 3 倍量のエタノールを添加し、各組織をポリトロンホモジナイザーPT10/35 を用いて氷中でホモジネートした。各試料を遠心した後 (18,800 g, 4°C, 3 min)、上清に抽出された画分を放射能検出器および質量分析計を装着させた HPLC システムにて分析し、代謝物の化学構造を同定した。なお分析条件は、実験の部 第 2 章の 6 と同様である。

#### 6) 血漿中薬物濃度推移

ラットに LO (0.1, 0.2, 0.4 mg/kg) を単回経鼻投与し、48 h までの各時点においてジエチルエーテル麻酔下で頸静脈から血液を採取した (N=4/群)。LO の加水分解を抑制するため、採血直後の血液に加水分解阻害剤である AEBSF (終濃度 5 mM) を添加し、次いで遠心 (18,800 g, 4°C, 3 min) により血漿試料を調製した。LO (0.4 mg/kg) および laninamivir (0.4 mg/kg) の単回静脈内投与も同様に実施し、血漿試料を調製した。血漿中 LO および laninamivir 濃度は、以下の固相抽出操作によりバリデートした測定法を用いて定量した。初めに、0.05 mL の血漿を 1 mL の  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$  (90/10/0.5, v/v/v) と混合し、これを予め  $\text{CH}_3\text{OH}$  と  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$  (90/10/0.5, v/v/v) で活性化しておいた固相抽出カートリッジ Oasis MCX 3 cc / 60 mg (Waters Corp.) に添加した。次いで、カートリッジを 3 mL の  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$  (90/10/0.5, v/v/v)、3 mL の 50%  $\text{CH}_3\text{OH}$  で洗浄した後、3 mL の  $\text{CH}_3\text{OH}/28\%$  ammonium hydroxide (100/5, v/v) で溶出した。溶出液を窒素気流下 (40°C 以下) で濃縮乾固後、残留物を 80  $\mu\text{L}$  の移動相 A/ $\text{CH}_3\text{OH}$  (50/50, v/v) に溶解し、これを測定試料とした。分析には、API4000 (Applied Biosystems) および Shimadzu 10A (株式会社島津製作所) からなる LC-MS/MS システムを使用した。また、内部標準物質には $^2\text{H}_3$ ]LO および  $^2\text{H}_3$ ]laninamivir を使用した。以下に LO および laninamivir の分析条件を示す。

#### HPLC 条件

システム	: Shimadzu 10A (Shimadzu Corp.)
カラム	: Atlantis HILIC Silica (3 $\mu\text{m}$ , 3.0 $\times$ 100 mm; Waters Corp.)
カラム温度	: 40°C

移動相 : A, 5 mM HCOONH<sub>4</sub>/HCOOH (1000/2, v/v)  
 B, CH<sub>3</sub>CN  
 グラジエント : Time (min), 0 → 4.5 → 4.51 → 5.1 → 5.11 → 8.0  
 B (%), 75 → 50 → 50 → 50 → 75 → 75  
 流速 (mL/min), 0.4 → 0.4 → 0.6 → 0.6 → 0.4 → 0.4  
 注入量 : 6 μL

#### MS/MS 条件

システム : API4000 (Applied Biosystems)  
 イオン化モード : ESI-positive  
 Curtain gas : N<sub>2</sub>, 20 (psi)  
 Collision gas : N<sub>2</sub>, 6 (arbitrary unit)  
 Ion source gas 1 : Air, 50 (psi)  
 Ion source gas 2 : Air, 60 (psi)  
 Ionspray 電圧 : 5500 V  
 Ion source 温度 : 650°C  
 Interface heater : on

	Multiple reaction monitoring condition	Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Collision cell exit potential (V)
LO	<i>m/z</i> 473 → <i>m/z</i> 60	80	46	6
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]LO	<i>m/z</i> 476 → <i>m/z</i> 60	80	46	6
Laninamivir	<i>m/z</i> 347 → <i>m/z</i> 60	65	35	6
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]Laninamivir	<i>m/z</i> 350 → <i>m/z</i> 60	65	35	6

#### 7) 薬物動態パラメータの算出

血漿中 LO および laninamivir 濃度推移から薬物動態パラメータを算出した。算出には WinNonlin Professional (version 4.0) を使用し、モデルは noncompartment model を使用した。C<sub>max</sub> および t<sub>max</sub> は実測値から求め、t<sub>1/2</sub> は消失相における 3 点以上の測定値を用いた片対数回帰分析により算出した。AUC<sub>last</sub> は台形法により算出し、AUC<sub>0-inf</sub> は AUC<sub>0-tz</sub> と C<sub>tz</sub>/λ との和で算出した (C<sub>tz</sub>: 時間 tz における濃度、λ: 消失速度定数)。LO および laninamivir の静脈内投与においては CL と V<sub>ss</sub> も算出した。また、LO の経気管投与時における生物学的利用率 (F) は、LO および laninamivir

ベースで算出し、その際、静脈内投与した laninamivir の投与量 (0.4 mg/kg) は LO 換算の投与量 (0.293 mg/kg) に変換した。

#### 8) 尿糞中放射能排泄

ラットに $[^{14}\text{C}]$ LO (0.2 mg/kg) を単回経鼻投与後、個体毎に代謝ケージに収容し、投与後 168 h までの各区間に尿および糞を回収した (N=4)。尿については、区間毎に一部 (0.1~0.5 mL) を採取した後、Hionic-Fluor (10 mL) と混合し、液体シンチレーションカウンター Model 2300TR で放射能を測定した。糞については、区間毎に  $\text{H}_2\text{O}$  で膨潤させた後、エタノールを添加してホモジネートした。糞ホモジネートの一部 (0.5 mL) を採取した後、NCS-II (1.5 mL) を添加して  $50^\circ\text{C}$  で振倒しながら溶解した。溶解後の試料は、Hionic-Fluor (10 mL) と混合し、尿と同様に放射能測定に供した。尿および糞中への放射能排泄率は、投与量に対する割合 (%) で表記した。また、尿および糞の残余試料 (それぞれ投与後 48 および 24 h まで) は、TLC による代謝物測定に供した。

#### 9) 胆汁中放射能排泄

胆管カニキュレを施したラットに $[^{14}\text{C}]$ LO (0.2 mg/kg) を単回経鼻投与後、個体毎にボールマンケージ (株杉山元医理器) に収容し、投与後 48 h までの各区間に胆汁を回収した (N=4)。区間毎に一部 (0.025~0.1 mL) を採取した後、NCS-II (0.5 mL) および Hionic-Fluor (10 mL) と混合し、液体シンチレーションカウンター Model 2300TR で放射能を測定した。胆汁中への放射能排泄率は、投与量に対する割合 (%) で表記した。また、残余試料 (投与後 6 h まで) は、TLC による代謝物測定に供した。

#### 10) TLC による代謝物測定

$[^{14}\text{C}]$ LO の経気管投与後における尿、糞、および胆汁試料を本測定に供した。各試料の一部に等量のエタノールを添加後、遠心した (18,800 g,  $4^\circ\text{C}$ , 3 min)。上清 40  $\mu\text{L}$  をシリカゲル TLC プレート (60 F254, 0.25 mm; Merk-KGaA, Germany) 上にスポットし、1-butanol/ $\text{H}_2\text{O}$ / $\text{CH}_3\text{COOH}$  (5/3/3, v/v/v) で展開した。風乾させた TLC プレートを保護膜で被い、イメージングプレート (BAS-III、富士フイルム株) に密着し、シールドボックス内で一晩露出した。イメージングプレート上に記録された放射能像をバイオイメージングアナライザーシステム (Fujix-BAS2000、富士フイルム株) を用いて読み取り、各試料中放射能に含まれる LO および laninamivir の存在比率 (%) を測定した。

## 第4章に関する実験の部

### 1) 試薬

LO および laninamivir は第一三共(株)で合成し<sup>102), 103)</sup>、それらの内部標準物質である $[^2\text{H}_3]\text{LO}$  および $[^2\text{H}_3]\text{laninamivir}$  も同様に第一三共(株)で合成した。 $[^{14}\text{C}]\text{LO}$  (20.8 mCi/mmol) は GE Healthcare UK Limited で合成した。Mouse epithelial cell enrichment kit は Stem Cell Technology Inc.から購入した。Dispase および collagenase A は、それぞれ Invitrogen および Roche Diagnostics GmbH から購入した。Urea Nitrogen B test kit および Ham's F-12K medium は和光純薬工業(株)から購入した。その他の一般試薬および溶媒は、特級、一級、HPLC 用あるいは LC/MS 用相当を用いた。

### 2) 動物

雌性 BALB/c マウスは日本チャールス・リバー(株)から 6 週齢で購入し、1 週間の馴化後に実験に供した。なお、固形試料 (FR-2) および水道水は、投与時を除いて自由摂取させた。

### 3) BAL 中、肺中、および血漿中薬物濃度推移

マウスに LO および laninamivir (各 0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) を単回経鼻投与し、24 h までの各時点にジエチルエーテル麻酔下で心臓より血液を採取した (N=3~4/時点)。次いで、気管を露出させた後、シリンジに装着したポリエチレンチューブ (株夏目製作所) をカニューレし、1 mL の PBS (pH 7.4) で気道内を 3 回洗浄して BAL を回収した。その後、肺全体を摘出した。LO の加水分解を抑制するため、採取直後の血液に加水分解阻害剤の AEBSF (終濃度 5 mM) を添加した後、遠心 (18,800 g, 4°C, 3 min) により血漿試料を調製した。BAL に対しても同様に AEBSF を添加した後、遠心 (650 g, 4°C, 10 min) により細胞や残屑を除去した。肺については、湿重量に対して 9 倍量の 50%  $\text{CH}_3\text{CN}$  を添加した後、Mixer Mill MM300 (Retsch GmbH, Germany) でホモジネートした。これらの試料 0.1 mL に等量の  $\text{CH}_3\text{CN}$  を添加して遠心した後 (18,800 g, 4°C, 3 min)、上清を薬物濃度測定に供した。測定には、API4000 および Shimadzu 20A (株島津製作所) からなる LC-MS/MS システムを使用した。また、内部標準物質には $[^2\text{H}_3]\text{LO}$  および $[^2\text{H}_3]\text{laninamivir}$  を使用した。以下に LO および laninamivir の分析条件を示す。

#### HPLC 条件

システム : Shimadzu 20A (Shimadzu Corp.)  
カラム : PC HILIC Silica (5  $\mu\text{m}$ , 2.0×150 mm; Shiseido Co., Ltd.)  
カラム温度 : 40°C

移動相 : A, 10 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>  
           B, CH<sub>3</sub>CN  
 グラジエント : Time (min), 0 → 8 → 8.01 → 10  
                   B (%), 80 → 60 → 80 → 80  
 流速 : 0.6 mL/min  
 注入量 : 8 μL

#### MS/MS 条件

システム : API4000 (Applied Biosystems)  
 イオン化モード : ESI-positive  
 Curtain gas : N<sub>2</sub>, 20 (psi)  
 Collision gas : N<sub>2</sub>, 6 (arbitrary unit)  
 Ion source gas 1 : Air, 50 (psi)  
 Ion source gas 2 : Air, 60 (psi)  
 Ionspray 電圧 : 5500 V  
 Ion source 温度 : 650°C  
 Interface heater : on

	Multiple reaction monitoring condition	Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Collision cell exit potential (V)
LO	<i>m/z</i> 473 → <i>m/z</i> 60	80	46	6
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]LO	<i>m/z</i> 476 → <i>m/z</i> 60	80	46	6
Laninamivir	<i>m/z</i> 347 → <i>m/z</i> 60	65	35	6
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]Laninamivir	<i>m/z</i> 350 → <i>m/z</i> 60	65	35	6

#### 4) Urea 濃度測定による ELF 中薬物濃度換算

BAL の回収による ELF の希釈率を求めるため、urea assay kit (Urea Nitrogen B test kit, 和光純薬工業株) を用いて BAL 中および血漿中の urea 濃度を測定した。血漿試料については、検量線の範囲 (0.5~10 mg/dL) に収めるため H<sub>2</sub>O で 5 倍希釈した (BAL は希釈せず)。得られた BAL 中の urea 濃度 (Urea<sub>BAL</sub>) および血漿中の urea 濃度 (Urea<sub>plasma</sub>) を用いて、以下の数式から BAL 中の薬物濃度 (C<sub>BAL</sub>) を補正することにより ELF 中の薬物濃度 (C<sub>ELF</sub>) を算出した<sup>104)</sup>。

$$C_{ELF} = C_{BAL} \times (Urea_{plasma} / Urea_{BAL})$$

## 5) 薬物動態パラメータの算出

ELF 中、肺中、血漿中の LO および laninamivir 濃度推移から薬物動態パラメータを算出した。算出には Phoenix WinNonlin (version 6.1) を使用し、モデルは noncompartment model を使用した。 $C_{\max}$  および  $t_{\max}$  は実測値から求め、 $t_{1/2}$  は消失相における 3 点以上の測定値を用いた片対数回帰分析により算出した。 $AUC_{\text{last}}$  は台形法により算出した。

## 6) ミクロオートラジオグラフィー

マウスに $[^{14}\text{C}]\text{LO}$  を単回経鼻投与し、0.25, 1, 6, 24 h 後にジエチルエーテル麻酔下で放血致死させた (N=1/時点)。屠体から気管支および肺を採取し、それらを 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。次いで、エタノールで脱水し、パラフィンに包埋した。そのパラフィン切片をマイクローム (大和光機工業株) で  $4\ \mu\text{m}$  の厚さにスライスし、MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業株) 上に乗せた。脱パラフィン化した後、スライドガラスを NTB-3 オートラジオグラフィー乳剤 (Carestream Health, Inc., NY) に浸し、冷暗所で 4 週間保管した。その後、フィルムを現像し、ヘマトキシリン-エオジンで組織切片を染色した後、黒点として見える放射能の分布を顕微鏡にて観察した。

## 7) マウス気道上皮細胞の調製と初代培養

Kumari らの報告<sup>63)</sup>に若干の変更を加えて、マウス気道上皮細胞を単離した。初めに、生理食塩液を肺の血管内に灌流させてマウスの肺から血液を除去した後、肺全体を摘出して約  $1\ \text{mm}^3$  の大きさに刻んだ。その組織片を dispase (2 mg/mL) とともに室温で 30 min インキュベートし、次いで collagenase A (2 mg/mL) を含有する Ham's F-12K 培地とともに  $37^\circ\text{C}$  で 2 h インキュベートすることにより、上皮細胞を遊離させた。350 g で 5 min 遠心した後、DNase I (約 100 U/mL) を含有する Ham's F-12K 培地を沈渣に添加して穏やかに懸濁し、室温で 5 min 放置した。その後、その懸濁液を  $70\ \mu\text{m}$  および  $40\ \mu\text{m}$  のメッシュで濾過した。350 g で 5 min 遠心した後、10 mM HEPES および 2% (v/v) FBS を含有する HBSS 溶液に沈渣を懸濁させ、次いで mouse epithelial enrichment kit を用いて上皮細胞を単離した。単離した細胞を 12 ウェルのコラーゲンコートプレート (BD Biosciences, NJ) に  $3 \times 10^5$  cells/well の細胞数で播種し、15% (v/v) FBS, 100 IU/mL penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin 添加の Ham's F-12K 培地でコンフルエントになるまで培養した ( $37^\circ\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$  下)。培地は 2~3 日毎に交換した。なお、上皮細胞の確認は、マウス抗 pan-cytokeratin 抗体の HRP 標識体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA) による免疫組織化学染色により行った (アイソタイプ抗体をネガティブコントロールとして使用)。

## 8) マウス初代培養気道上皮細胞における薬物の取り込み

12-ウェルプレート上に培養した気道上皮細胞を Ham's F-12K 培地（血清および添加物無し）で洗浄した後、Ham's F-12K 培地中（1 mL/well）で 37°C 下、30 min プレインキュベートした。LO の細胞取り込みタイムコースでは、50 μM の LO を各ウェルに添加し、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C 下、120 min までインキュベートした (triplicate)。LO の取り込み濃度依存性では、10~1000 μM の LO を添加し、60 min までインキュベートした (triplicate)。インキュベート終了後、氷冷した PBS (3 mL, pH 7.4) で細胞を 3 回洗浄し、次いで 0.5% (v/v) Triton X-100 (0.2 mL/well) で細胞を可溶化して薬物濃度測定に供した。なお、試料中の蛋白濃度は、Lowry 法により BSA を標準蛋白質として測定した。

## 9) マウス初代培養気道上皮細胞からの薬物の放出

50 μM の LO で細胞を 60 min インキュベートした後（1 mL/well）、予め温めておいた Ham's F-12K 培地（3 mL）で細胞を 3 回洗浄し、さらに Ham's F-12K 培地でインキュベートした。所定の時間（0.5, 1, 2, 4, 24 h）に、ウェルから培地を回収するとともに新たに Ham's F-12K 培地を加えながら 24 h までインキュベートした。インキュベート終了後の細胞は、上記 8 と同様に、氷冷した PBS による洗浄および 0.5% (v/v) Triton X-100 による可溶化を行った。回収した培地および可溶化した細胞をともに薬物濃度測定に供した。なお、細胞の蛋白濃度は、先と同様に Lowry 法により測定した。

## 10) コンパートメントモデル解析

上記 9 で得られた薬物放出のデータを基に、非線形最小二乗回帰を用いてコンパートメントモデル解析を実施した。解析には Phoenix WinNonlin (version 6.1) を使用し、作成したコンパートメントモデル (Fig. 4.7) を上記 9 で得られたデータに同時に当てはめた。各コンパートメントにおける物質収支式を以下に示す。

$$\begin{aligned}\frac{dLO_M}{dt} &= k_{LO} \cdot LO_C \\ \frac{dLO_C}{dt} &= -k_{LO} \cdot LO_C - k_{Hydrolysis} \cdot LO_C \\ \frac{dLani_C}{dt} &= k_{Hydrolysis} \cdot LO_C - k_{Lani} \cdot Lani_C \\ \frac{dLani_M}{dt} &= k_{Lani} \cdot Lani_C\end{aligned}$$

ここで、LO<sub>M</sub>およびLani<sub>M</sub>は培地中の LO および laninamivir 濃度、LO<sub>C</sub>およびLani<sub>C</sub>は細胞中の LO

および laninamivir 濃度、 $k_{LO}$  および  $k_{Lani}$  は細胞内に存在する LO および laninamivir の細胞外コンパートメントへの放出速度定数、 $k_{Hydrolysis}$  は細胞内コンパートメントにおける LO の加水分解速度定数を示す。なお、各時点において Ham's F-12K 培地を新たに交換したため、細胞中の薬物濃度に比べて培地中の薬物濃度が十分に低いことから、LO および laninamivir の細胞内への取り込み速度はゼロと見なした。

## 謝辞

本研究を通じ、終始御懇篤なるご指導、御鞭撻を賜りました熊本大学薬学部 今井輝子教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文作成に際し、有益な御助言と御校閲を賜りました熊本大学薬学部 大槻純男教授および熊本大学医学部附属病院薬剤部 齋藤秀之教授に謹んで深く感謝の意を表します。

本研究は第一三共株式会社 薬物動態研究所で行われたものであり、研究の機会を与えて頂くとともに、終始御懇篤なるご指導および多数の有益なご助言を賜りました薬物動態研究所長 泉高司博士および前所長 岡崎治博士に厚く御礼申し上げます。

本研究全般に渡り、終始直接のご指導、ご助言、激励を賜りました第一三共株式会社薬物動態研究所 中井大介博士、小林信博博士、三浦慎一博士に心より感謝申し上げます。また、本研究に協力して下さった高橋信氏、中井直子氏、山村直敏博士、星美佐氏、村井孝弘博士、高草英生博士、稲葉真一氏をはじめ支援して下さった多くの皆様に深く御礼申し上げます。

最後に私事ですが、これまで私を支え、かつ激励してくれた家族に心より感謝致します。

## 参考文献

- 1) Simonsen L., *Vaccine*, **17**, Suppl. 1, S3–10 (1999).
- 2) Monto A. S., *Vaccine*, **26**, Suppl. 4, D45–48 (2008).
- 3) Lamb R. A., Choppin P. W., *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 467–506 (1983).
- 4) Lamb R. A., “The Influenza Viruses,” ed. by Krug R. M., Plenum Press, New York, 1989, pp. 1–87.
- 5) Fouchier R. A., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T. M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G. F., Olsen B., Osterhaus A. D., *J. Virol.*, **79**, 2814–2822 (2005).
- 6) Alexander D. J., *Vaccine*, **25**, 5637–5644 (2007).
- 7) Hsieh Y. C., Wu T. Z., Liu D. P., Shao P. L., Chang L. Y., Lu C. Y., Lee C. Y., Huang F. Y., Huang L. M., *J. Formos. Med. Assoc.*, **105**, 1–6 (2006).
- 8) Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood F. S., Jain S., Finelli L., Shaw M. W., Lindstrom S., Garten R. J., Gubareva L. V., Xu X., Bridges C. B., Uyeki T. M., *N. Engl. J. Med.*, **360**, 2605–2615 (2009).
- 9) World Health Organization. “World now at the start of 2009 influenza pandemic.”: <[http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1\\_pandemic\\_phase6\\_20090611/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html)>, cited 11 June, 2009.
- 10) World Health Organization. “H1N1 in post-pandemic period.”: <[http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1\\_vpc\\_20100810/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/index.html)>, cited 10 August, 2010.
- 11) Subbarao K., Klimov A., Katz J., Regnery H., Lim W., Hall H., Perdue M., Swayne D., Bender C., Huang J., Hemphill M., Rowe T., Shaw M., Xu X., Fukuda K., Cox N., *Science*, **279**, 393–396 (1998).
- 12) Yuen K. Y., Chan P. K., Peiris M., Tsang D. N., Que T. L., Shortridge K. F., Cheung P. T., To W. K., Ho E. T., Sung R., Cheng A. F., *Lancet*, **351**, 467–471 (1998).
- 13) 厚生労働省 “新型インフルエンザ対策行動計画・ガイドライン” : <<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou04/13.html>>, cited 17 February, 2009.
- 14) Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y., *Microbiol. Rev.*, **56**, 152–179 (1992).
- 15) Lamb R. A., Krug R. M., “Fields Virology,” 4th ed., eds. by Knipe D. M., Howley P. M., Lippincott, Philadelphia, 2001, pp. 1487–1531.
- 16) 日本臨床内科医会インフルエンザ研究班編, 日臨内科医会誌, **26**, Suppl. 2, 15–21 (2011).
- 17) World Health Organization. “WHO guidelines on the use of vaccines and antivirals during influenza pandemics.”: <[http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/11\\_29\\_01\\_A.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/11_29_01_A.pdf)>, cited August, 2004.

- 18) Schwab R. S., England A. C. Jr., Poskanzer D. C., Young R. R., *JAMA*, **208**, 1168–1170 (1969).
- 19) Nagaswami S., Nagaswami R., *Dis. Nerv. Syst.*, **34**, 253–258 (1973).
- 20) Ohtomo E., Saso S., Araki G., Hirai S., Atarashi J., Hasegawa K., Ishizu H., *Clin. Eval.*, **12**, 321–367 (1984).
- 21) アマンタジン 添付文書 (2009年6月改訂, 第14版)
- 22) オセルタミビルカプセル 添付文書 (2010年7月改訂, 第22版)
- 23) オセルタミビルドライシロップ 添付文書 (2012年5月改訂, 第23版)
- 24) ザナミビル 添付文書 (2013年1月改訂, 第14版)
- 25) ペラミビル 添付文書 (2011年8月改訂, 第5版)
- 26) ラニナミビル 添付文書 (2012年2月改訂, 第5版)
- 27) Oxford J. S., Logan I. S., Potter C. W., *Nature*, **226**, 82–83 (1970).
- 28) Davies W. L., Grunert R. R., Haff R. F., McGahen J. W., Neumayer E. M., Paulshock M., Watts J. C., Wood T. R., Hermann E. C., Hoffmann C. E., *Science*, **144**, 862–863 (1964).
- 29) Hay A. J., *Semin. Virol.*, **3**, 21–30 (1992).
- 30) 辻 克郎, 岩橋 潤, 今村 宜寛, 吉本 静志, 梶原 淳睦, 石橋 哲也, 森 良一, 山田 達夫, 豊田 哲也, *ウイルス*, **51**, 135–141 (2001).
- 31) Advisory Committee on Immunization Practices, Smith N. M., Bresee J. S., Shay D. K., Uyeki T. M., Cox N. J., Strikas R. A., *MMWR Recomm. Rep.*, **55**, 1–42 (2006).
- 32) Deyde V. M., Xu X., Bright R. A., Shaw M., Smith C. B., Zhang Y., Shu Y., Gubareva L. V., Cox N. J., Klimov A. I., *J. Infect. Dis.*, **196**, 249–257 (2007).
- 33) Gubareva L. V., Kaiser L., Hayden F. G., *Lancet*, **355**, 827–835 (2000).
- 34) Moscona A., *N. Engl. J. Med.*, **353**, 1363–1373 (2005).
- 35) Barik S., *BMC Med.*, **10**, 104 (2012).
- 36) Carr J., Ives J., Kelly L., Lambkin R., Oxford J., Mendel D., Tai L., Roberts N., *Antiviral. Res.*, **54**, 79–88 (2002).
- 37) Ives J. A., Carr J. A., Mendel D. B., Tai C. Y., Lambkin R., Kelly L., Oxford J. S., Hayden F. G., Roberts N. A., *Antiviral. Res.*, **55**, 307–317 (2002).
- 38) Kiso M., Mitamura K., Sakai-Tagawa Y., Shiraishi K., Kawakami C., Kimura K., Hayden F. G., Sugaya N., Kawaoka Y., *Lancet*, **364**, 759–765 (2004).
- 39) Yamashita M., Tomozawa T., Kakuta M., Tokumitsu A., Nasu H., Kubo S., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**: 186–192 (2009).
- 40) Honda T., Kubo S., Masuda T., Arai M., Kobayashi Y., Yamashita M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 2938–2940 (2009).
- 41) Kubo S., Tomozawa T., Kakuta M., Tokumitsu A., Yamashita M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54**,

- 1256–1264 (2010).
- 42) Itoh Y., Shinya K., Kiso M., Watanabe T., Sakoda Y., Hatta M., Muramoto Y., Tamura D., Sakai-Tagawa Y., Noda T., Sakabe S., Imai M., Hatta Y., Watanabe S., Li C., Yamada S., Fujii K., Murakami S., Imai H., Kakugawa S., Ito M., Takano R., Iwatsuki-Horimoto K., Shimojima M., Horimoto T., Goto H., Takahashi K., Makino A., Ishigaki H., Nakayama M., Okamatsu M., Takahashi K., Warshauer D., Shult P. A., Saito R., Suzuki H., Furuta Y., Yamashita M., Mitamura K., Nakano K., Nakamura M., Brockman-Schneider R., Mitamura H., Yamazaki M., Sugaya N., Suresh M., Ozawa M., Neumann G., Gern J., Kida H., Ogasawara K., Kawaoka Y., *Nature*, **460**, 1021–1025 (2009).
  - 43) Kiso M., Kubo S., Ozawa M., Le Q. M., Nidom C. A., Yamashita M., Kawaoka Y., *PLoS. Pathog.*, **6**, e1000786.
  - 44) Watanabe A., Chang S. C., Kim M. J., Chu D. W., Ohashi Y. MARVEL Study Group, *Clin. Infect. Dis.*, **51**, 1167–1175 (2010).
  - 45) Sugaya N., Ohashi Y., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54**, 2575–2582 (2010).
  - 46) Ryan D. M., Ticehurst J., Dempsey M. H., Penn C. R., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 2270–2275 (1994).
  - 47) Cass L. M., Efthymiopoulos C., Bye A., *Clin. Pharmacokinet.*, **36**, 1–11 (1999).
  - 48) Bergstrom M., Cass L. M., Valind S., Westerberg G., Lundberg E. L., Gray S., Bye A., Langstrom B., *Clin. Pharmacokinet.*, **36**, 33–39 (1999).
  - 49) Peng A. W., Milleri S., Stein D. S., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 1974–1976 (2000).
  - 50) Davies B., Morris T., *Pharm. Res.*, **10**, 1093–1095 (1993).
  - 51) Hattori K., Kamio M., Nakajima E., Oshima T., Satoh T., Kitagawa H., *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 2051–2056 (1981).
  - 52) Mentlein R., Ronai A., Robbi M., Heymann E., von Deimling O., *Biochim. Biophys. Acta.*, **913**, 27–38 (1987).
  - 53) Triolo A. J., Coon J. M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **154**, 613–623 (1966).
  - 54) Prass R. L., Isohashi F., Utter M. F., *J. Biol. Chem.*, **255**, 5215–5223 (1980).
  - 55) Yamada J., Furihata T., Tamura H., Watanabe T., Suga T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **326**, 106–114 (1996).
  - 56) Ishizuka H., Yoshiba S., Okabe H., Yoshihara K., *J. Clin. Pharmacol.*, **50**, 1319–1329 (2010).
  - 57) Ishizuka H., Toyama K., Yoshiba S., Okabe H., Furuie H., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 3873–3878 (2012).
  - 58) Widdicombe J. H., Bastacky S. J., Wu D. X., Lee C. Y., *Eur. Respir. J.*, **10**, 2892–2897 (1997).
  - 59) Nicod L. P., *Respiration*, **66**, 2–11 (1999).
  - 60) Davis G. S., Giancola M. S., Costanza M. C., Low R. B., *Am. Rev. Respir. Dis.*, **126**, 611–616 (1982).
  - 61) Rodvold K. A., George J. M., Yoo L., *Clin. Pharmacokinet.*, **50**, 637–664 (2011).
  - 62) Rodvold K. A., Yoo L., George J. M., *Clin. Pharmacokinet.*, **50**, 689–704 (2011).

- 63) Kumari M., Saxena R. K., *Infect. Immun.*, **79**, 3159–3167 (2011).
- 64) Schweizer J., Bowden P. E., Coulombe P. A., Langbein L., Lane E. B., Magin T. M., Maltais L., Omary M. B., Parry D. A., Rogers M. A., Wright M. W., *J. Cell Biol.*, **174**, 169–174 (2006).
- 65) Brown R. A. Jr., Schanker L. S., *Drug Metab. Dispos.*, **11**, 355–360 (1983).
- 66) Tronde A., Nordén B., Jeppsson A. B., Brunmark P., Nilsson E., Lennernäs H., Bengtsson U. H., *J. Drug Target.*, **11**, 61–74 (2003).
- 67) Effros R. M., Mason G. R., *Am. Rev. Respir. Dis.*, **127**, S59–65 (1983).
- 68) Schneeberger E. E., “The Lung: Scientific Foundations,” eds. by Crystal R. G., West J. B., Barnes P. J., Cherniack N. S., Weibel E. R., Raven Press, New York, 1991, pp. 205–214.
- 69) Huttunen K. M., Raunio H., Rautio J., *Pharmacol. Rev.*, **63**, 750–771 (2011).
- 70) Rautio J., Laine K., Gynther M., Savolainen J., *AAPS J.*, **10**, 92–102 (2008).
- 71) Brewster M. E., Anderson W., Bodor N., *J. Pharm. Sci.*, **80**, 843–846 (1991).
- 72) Mizrachi Y., Rubinstein A., Harish Z., Biegon A., Anderson W. R., Brewster M. E., *AIDS*, **9**, 153–158 (1995).
- 73) Brewster M. E., Anderson W. R., Webb A. I., Pablo L. M., Meinsma D., Moreno D., Derendorf H., Bodor N., Pop E., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 122–128 (1997).
- 74) Chen Z. R., Irvine R. J., Bochner F., Somogyi A. A., *Life Sci.*, **46**, 1067–1074 (1990).
- 75) Okura T., Hattori A., Takano Y., Sato T., Hammarlund-Udenaes M., Terasaki T., Deguchi Y., *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 2005–2013 (2008).
- 76) del Amo E. M., Urti A., Yliperttula M., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **35**, 161–174 (2008).
- 77) Tapfer M. K., Sebestyén L., Kurucz I., Horvath K., Szelenyi I., Bodor N., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **77**, 423–429 (2004).
- 78) Sziráki I., Horváth K., Bodor N., *Pharmazie*, **61**, 140–143 (2006).
- 79) Erion M. D., van Poelje P. D., Mackenna D. A., Colby T. J., Montag A. C., Fujitaki J. M., Linemeyer D. L., Bullough D. A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**, 554–560 (2005).
- 80) Erion M. D., Bullough D. A., Lin C. C., Hong Z., *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **7**, 109–117 (2006).
- 81) Tillmann H. L., *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **8**, 682–690 (2007).
- 82) Reddy K. R., Matelich M. C., Ugarkar B. G., Gómez-Galeno J. E., DaRe J., Ollis K., Sun Z., Craig W., Colby T. J., Fujitaki J. M., Boyer S. H., van Poelje P. D., Erion M. D., *J. Med. Chem.*, **51**, 666–676 (2008).
- 83) Worth D. P., Harvey J. N., Brown J., Lee M. R., *Clin. Sci. (Lond)*, **69**, 207–214 (1985).
- 84) Drieman J. C., van Kan F. J., Thijssen H. H., van Essen H., Smits J. F., Struijker Boudier H. A., *Br. J. Pharmacol.*, **111**, 1117–1122 (1994).
- 85) Ehrhardt C., Kneuer C., Bies C., Lehr C. M., Kim K. J., Bakowsky U., *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **18**, 165–170 (2005).
- 86) Horvath G., Schmid N., Fragoso M. A., Schmid A., Conner G. E., Salathe M., Wanner A., *Am. J.*

- Respir. Cell Mol. Biol.*, **36**, 53–60 (2007).
- 87) Glube N., Closs E., Langguth P., *Mol. Pharm.*, **4**, 160–168 (2007).
- 88) Nakamura T., Nakanishi T., Haruta T., Shirasaka Y., Keogh J. P., Tamai I., *Mol. Pharm.*, **7**, 187–195 (2010).
- 89) Matsukawa Y., Lee V. H., Crandall E. D., Kim K. J., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 305–309 (1997).
- 90) Patton J. S., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **19**, 3–36 (1996).
- 91) Schanker L. S., Hemberger J. A., *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 2599–2601 (1983).
- 92) Hastings R. H., Grady M., Sakuma T., Matthay M. A., *J. Appl. Physiol.*, **73**, 1310–1316 (1992).
- 93) Niven R. W., “Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology,” ed. by Hickey A. J., Marcel Dekker Inc., Chicago, 1992, pp. 321–359.
- 94) Somers G. I., Lindsay N., Lowdon B. M., Jones A. E., Freathy C., Ho S., Woodrooffe A. J., Bayliss M. K., Manchee G. R., *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 1797–1805 (2007).
- 95) Zhang J. Y., Wang Y., Prakash C., *Curr. Drug Metab.*, **7**, 939–948 (2006).
- 96) Bosquillon C., *J. Pharm. Sci.*, **99**, 2240–2255 (2010).
- 97) Endter S., Francombe D., Ehrhardt C., Gumbleton M., *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**, 583–591 (2009).
- 98) Liederer B. M., Borchardt R. T., *J. Pharm. Sci.*, **95**, 1177–1195 (2006).
- 99) Hukkanen J., Pelkonen O., Raunio H., *Eur. Respir. J. Suppl.*, **32**, 122s–126s (2001).
- 100) Hukkanen J., Pelkonen O., Hakkola J., Raunio H., *Crit. Rev. Toxicol.*, **32**, 391–411 (2002).
- 101) Bernauer U., Heinrich-Hirsch B., Tönnies M., Peter-Matthias W., Gundert-Remy U., *Toxicol. Lett.*, **164**, 278–288 (2006).
- 102) Honda T., Masuda T., Yoshida S., Arai M., Kobayashi Y., Yamashita M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 1921–1924 (2002).
- 103) Honda T., Masuda T., Yoshida S., Arai M., Kaneko S., Yamashita M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 1925–1928 (2002).
- 104) Rennard S. I., Basset G., Lecossier D., O'Donnell K. M., Pinkston P., Martin P. G., Crystal R. G., *J. Appl. Physiol.*, **60**, 532–538 (1986).