

原 著

Benzbromarone (Urinorm[®]) の代謝・毒性および薬理作用に関する研究国嶋 千代子¹⁾, 井上 郁夫²⁾, 及川 寿浩¹⁾, 片山 茂裕²⁾The Metabolism, Toxicity and Pharmacological Studies of Benzbromarone (Urinorm[®])

Chiyoko Kunishima^a, Ikuo Inoue^b, Toshihiro Oikawa^a, Shigehiro Katayama^b (^aPharmacovigilance Department of Torii Pharmaceutical Co., Ltd, 3-4-1, Nihonbashihoncho, Chuo-ku, Tokyo 103-8439, Japan and ^bFourth Department of Internal Medicine, Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Sporadic reports of mild hepatic dysfunction as an adverse reaction of Benzbromarone have appeared in recent years, and in some cases, fulminant hepatitis has developed. We first investigated metabolites of Benzbromarone, using LC/MS, and identified the metabolites of Benzbromarone *in vitro*. Results showed that human liver S9 metabolites of Benzbromarone consist of two hydroxy bodies, two monohydroxy bodies and five 1'-ketone bodies; previous reports (except that debromination products were not detected) suggest that Benzarone (possibly related to hepatotoxicity) is not formed in humans. We also identified CYP molecular species related to the metabolism of Benzbromarone, by use of a human P450-expressing microsome system. We found that Benzbromarone is metabolized by CYP2C9*1 and 2C9*2, and the main metabolite is 6-hydroxylbenzbromarone. A study of the inhibitory action of Benzbromarone on human P450 molecular species showed that Benzbromarone has especially potent inhibitory action on CYP2C8/9. Therefore, it was clear that Benzbromarone is metabolized by CYP2C9 and inhibits CYP2C8 and CYP2C9. Deaths caused by fulminant hepatitis in patients given the antidiabetic troglitazone (Noscal), a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ agonist, have recently been reported. It has also been reported that the mechanism of onset is by the induction of hepatocellular apoptosis by excessive increase of PPAR- γ activity. Because Benzbromarone has long been considered to be a peroxisome proliferating agent, we studied the action of Benzbromarone on PPAR- α and PPAR- γ . The results indicated that Benzbromarone is a ligand of PPAR- α . Our results suggest that the hepatic dysfunction associated with Benzbromarone is not caused by apoptosis.

Keywords: Benzbromarone, PPAR, CYP

J Saitama Med School 2003;30:187-194

(Received August 8, 2003)

緒 言

Benzbromarone (Urinorm[®]) は痛風治療薬として 20 年以上にわたり広く安全に使用されている薬剤である。その尿酸低下作用のメカニズムについては、尿細管における尿酸再吸収の抑制といわれており、近年、尿細管上皮に局在するトランスポーター URAT1 への尿酸取り込み阻害によることが明らかにされた¹⁾。一方で、Benzbromarone の代謝に関してはいまだ明らかにされていない。

近年、Benzbromarone による副作用として、軽度な肝機能障害の報告が散見され、劇症肝炎へ移

行する例も認められている。Benzbromarone は benzofran 誘導体で、1972 年の Broekhuysen らのトリチウムラベル Benzbromarone を用いた代謝研究では、Benzbromarone は肝で脱ハロゲン化され Benzarone と Bromobenzarone に代謝されると報告されていた²⁾。Benzarone はかつて末梢静脈不全症の治療薬として広く使用されていたが、重篤な肝障害を引き起こすとして販売が中止されている³⁾。一方、1980 年代後半から、測定技術の進歩に伴い Benzbromarone の主代謝物は脱ブロム体である Benzarone および Bromobenzarone ではなくヒドロキシ体である 1-hydroxylbenzbromarone あるいは 6-hydroxylbenzbromarone であると報告された⁴⁻⁶⁾。Benzbromarone 代謝物に関するこれらの知見は、*in vitro* 試験ではまだ立証されていない。そこ

1) 鳥居薬品株式会社医薬情報部 2) 埼玉医科大学第四内科学教室
[平成 15 年 8 月 8 日受付]

で我々はまず, Benzbromarone の代謝産物を Liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS) によって調べ, Benzbromarone の代謝産物について解明することとした. 一方で, 最近, 糖尿病治療薬である peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ のアゴニストであるトログリタゾン (ノスカル) も, 臨床使用開始後, 国内では約 3 年間で約 110 人の患者に肝機能障害が発症し, うち 9 人が劇症肝炎により死亡したとの報告がされ⁷⁾, 発現状況が Benzbromarone による肝機能障害と類似している. トログリタゾン投与による劇症肝炎の発症機序として, 過剰な PPAR γ の活性亢進による肝細胞のアポトーシスの誘因との報告もあり, 近年, 薬剤性肝障害の発症機序として肝細胞のアポトーシスも注目されてきている⁷⁾. 最近我々は, PPAR のもう一つのサブタイプである PPAR α のアゴニストで, 抗高脂血症薬であるフィブラート系薬剤もまた, PPAR α を介してアポトーシスの進展機序に関与することを報告している⁸⁾. また, Benzbromarone は peroxisome 増殖剤であることも以前から示唆されている⁹⁾. 以上を考慮すると, Benzbromarone による肝機能障害の機序に PPAR の関与が示唆される.

一般的に, 薬物性肝障害の発症機序としては, アセトアミノフェンや四塩化炭素に代表される中毒性肝障害, あるいは, 薬剤が高分子蛋白と結合して免疫原となるアレルギー性肝障害および薬物代謝酵素であるチトクローム P450 (CYP) の分子種の遺伝的多型に起因する薬物代謝異常による肝障害などがある. なかでも, 最近, CYP と転写因子, 特に PPAR との関わりが非常に注目され, さまざまな CYP に関わる酵素の蛋白発現の調節因子として作用するとの報告もある¹⁰⁾.

そこで, 本研究では, Benzbromarone の代謝に関わる CYP 分子種についても明らかにし, Benzbromarone による肝障害発症の機序がどの CYP による薬物代謝異常によるものか否かを検討した. さらに, Benzbromarone の PPAR α および PPAR γ に対するリガンド親和性を明らかにすることで, Benzbromarone の代謝に関わる CYP 分子種にどのように PPAR α および PPAR γ が関与するかについて考察する.

実験材料

Benzbromarone の in vitro 代謝試験では個別 10 例を合わせて調整したヒト P450 発現系ミクロゾーム (GENTEST 社) およびヒト肝ミクロゾーム (GENTEST 社) および, ¹⁴C-Benzobromarone, 6-Hydroxybenzbromarone (第一化学薬品株式会社), Benzbromarone (鳥居薬品株式会社) を使用した (Fig.1). P450 分子種に対する阻害作用 試験での各分子種 CYP1A, CYP2C8/9, CYP2C19,

CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP4A11 に対する陽性対照物質はそれぞれ, α -Naphthoflavone (SIGMA), Sulfaphenazole (SIGMA), Tranylcypromine (SIGMA), Quinidine (SIGMA), Diethyldithiocarbamate (SIGMA), Ketoconazole (ICN), anti-rat CYP4A1 serum を, モデル基質はそれぞれ Ethoxyresorufin, Tolbutamide, S-(+)-Mephenytoin, (±)-Bufuralol, Chlorzoxazone, Testosterone, ¹⁴C-Lauric acid を使用した. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による ¹⁴C-Benzobromarone の純度および代謝物の検出は, LC-10Avp (島津製作所) を用い, 放射能は FLO-ONE/525TR (パッカー) で検出した. LC/MS での代謝物の確認には, TSQ-7000 (サーモクエスト) および 2690 (ウォータース) を用いた.

PPAR α および γ に対する活性化能の検討では, NIH3T3 細胞 (東京大学), ルミキットダイアルルシフェラーゼ (ダイアトロン) を使用し, ルシフェラーゼ活性の測定は CT-9000D (ダイアトロン) を用いた. 被験薬物は Benzbromarone, Troglitazone, Fenofibric acid, Clofibric acid を使用した. PPAR α および γ のタンパクレベルに対する検討ではヒト腎 293T 細胞, 抗 PPAR α , PPAR γ 抗体 (Santa Cruz), 抗ウサギ蛍光標識抗体 (The Binding Site) を使用した. 培地は D-MEM に 10% FBS, ペニシリン, ストレプトマイシンを加えたものを使用した.

試験方法

1. Benzbromarone の in vitro 代謝試験

1-1. 代謝物の構造推定

¹⁴C-Benzobromarone および Benzbromarone を 1:3 (w/w) に混合し, ヒト肝 S9 (GENTEST) 1 mg protein/mL を用いて, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4), NADPH 生成系補酵素 (13 mM β -NADP⁺, 33 mM glucose-6-phosphate, 10 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 33 mM MgCl₂) 存在下にてインキュベートした. インキュベート後, 試料を Bond Elut C18 (Varian SPP) にアプライし, 1% 酢酸で洗浄した後, メタノールで溶出した. 溶出液を減圧乾固した後, トリフルオロ酢酸/メタノール (1:1, v/v) に溶解し, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて ¹⁴C-Benzobromarone の純度および代謝物を検出した. 代謝物の確認は LC/MS にて以下の条件で測定した.

HPLC 条件: (分析カラム: Capcell pak C₁₈ UCI20 2.0 mm I.D.x150 mm L (Shiseido)), 移動相 (5 mM 酢酸アンモニウム, アセトニトリル), MS 条件: 測定モード (APCI(-)), ペーパーライザー (300°C), 加熱キャピラリー (170°C), マルチプライヤー (1400 V), シーガス (N₂, 70 psi), オグジラリヤーガス (N₂, 5 unit), 測定時間 (5~50 分).

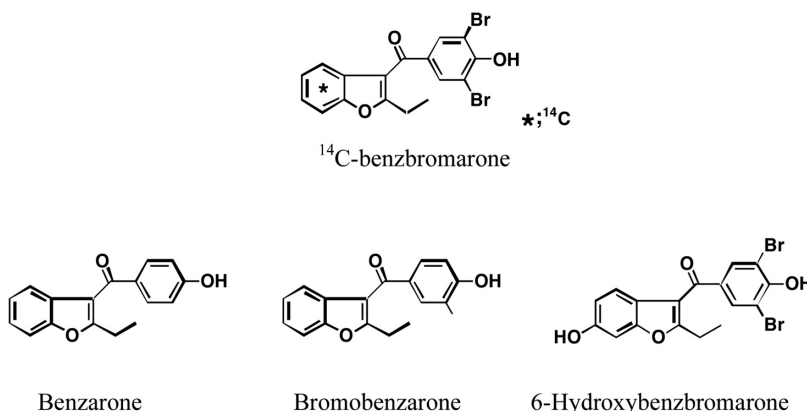


Fig. 1. Chemical structure of ¹⁴C-benzbromarone and its related compounds.

1-2. ヒト P450 分子種の推定試験

¹⁴C-Benzbromarone (最終濃度 5 および 50 M) をヒト P450 発現系マイクロゾーム (リンパ芽球様細胞系: CYP1A2, 2C9*1 (Wild), 2C9*2 (Arg → Cys), 2C19, 2D6*1 (Wild), 2E1, 3A4, 4A11) および 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4), NADPH 生成系補酵素 (13 mM β-NADP⁺, 33 mM glucose-6-phosphate, 10 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 33 mM MgCl₂) 存在下にて, 37℃でインキュベートした. 所定時間インキュベート後, 1 M クエン酸溶液を用いて反応を停止し, 試料を Bond Elut C18 (Varian SPP) にアプライし, 1%酢酸で洗浄した後, メタノールで溶出した. メタノール溶出液および酢酸洗浄液は液体シンチレーションカウンターを用いて溶出液中および洗浄液中の放射エネルギーを測定した. 残りのメタノール溶出液を減圧乾固後, HPLC-RAD 分析を行った. コントロールとして加熱処理したヒト肝マイクロゾームを添加した試料を同様に操作した.

1-3. ヒト P450 分子種に対する酵素阻害作用

Benzbromarone (最終濃度 1, 10 および 100 M) あるいは陽性対照物質をヒト肝マイクロゾームおよび 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4), モデル基質と 37℃でプレインキュベート後, NADPH 生成系補酵素 (13 mM β-NADP⁺, 33 mM glucose-6-phosphate, 10 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 33 mM MgCl₂) 存在下にて, 37℃でインキュベートした. 所定時間インキュベート後, 1M クエン酸溶液を用いて反応を停止し, 各モデル基質代謝物を HPLC あるいは LC/MS にて定量した. コントロールとして, 100℃で 10 分間加熱処理したヒト肝マイクロゾームを添加した試料および Benzbromarone 非添加の試料を同様に操作した.

2. PPAR α および γ に対する作用の検討

2-1. 活性化能に対する検討

NIH3T3 細胞をウェルに播き, 20 時間後にレセプター発現プラスミド (pM-hPPAR α あるいは pM-hPPAR γ) およびレポータープラスミド (pG5tkLuc3) をリポフェクトアミン試薬 (GibcoBRL) を用いて細胞にトランスフェクションした. なお, レセプター非発現処理として, レセプター遺伝子を含まない発現ベクターとレポータープラスミドをトランスフェクションした処理を行った. トランスフェクション 6 時間後に被験薬物 (最終濃度 0–100 μM) を添加した培地に交換し, 2 日間培養した. 細胞を PBS で洗浄後, 溶解し, ルシフェラーゼ活性を測定した (Fig. 2). 被験薬物は DMSO に溶解し, 培地に最終濃度 0.1% となるように添加した.

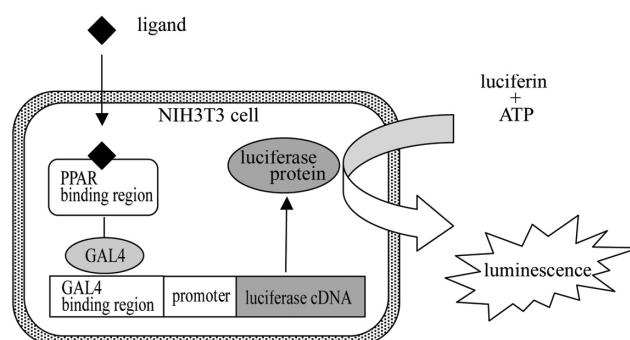


Fig. 2. The cells were transfected with receptor plasmid for the chimera of PPAR γ or PPAR α ligand binding domain and the GAL4 DNA-binding domain, together with a receptor plasmid containing a GAL4 responsive promoter driving the expression of luciferase. After 6 hr, the cells were given the test compounds and were cultured for an additional 2 days. After the cells were lysed, luciferase activity was determined.

2-2. タンパク発現レベルに対する検討

293T 細胞の培地に Benzbromarone (最終濃度 0, 10 μ M) を添加し 24 時間培養した. 細胞を溶解液 (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 100 μ g/mL PMSF, 30 μ g/mL aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate) にて溶解し, 遠心後, その上清を抽出し蛋白測定を行った. 各蛋白量を PBS で調整後, SDS-polyacrylamide gel で電気泳動し, ニトロセルローズ膜に転写した. 膜を抗 PPAR- α および γ 抗体とともにインキュベートした後, 膜を洗浄し, peroxidase 標識抗ウサギ二次抗体にてインキュベートし, その発光強度を評価した.

結 果

1-1. 代謝物の構造推定 (Fig. 3-1, 2, Fig. 4)

Benzbromarone および代謝物標品である Benzarone, Bromobenzarone, 6-Hydroxybenzbromarone の HPLC

プロファイルを確認した. その結果, 保持時間約 15 分に Benzarone, 約 20 分に 6-Hydroxybenzbromarone, 約 23 分に Bromobenzarone, および約 30 分に Benzbromarone が認められた (Fig. 3-1). 14 C-Benzbromarone を 1 μ g/mL 濃度で, ヒト肝 S9 とインキュベーションした試料の HPLC-RAD 分析を行った. その結果, 保持時間 10 分, 12 分, 17 分, 20 分, 21 分および 31 分付近に計 6 種のピークが認められた. そのうち 20 分および 31 分付近のピークは, 標品 6-Hydroxybenzbromarone および Benzbromarone と保持時間が一致した. 一方, Benzarone および Bromobenzarone の保持時間に代謝物ピークは認められなかった (Fig. 3-2). 次に, 14 C-Benzbromarone を 1 μ g/mL 濃度で, ヒト肝 S9 とインキュベーションした試料の LC/MS 測定を行った結果, その MS クロマトグラムと MS スペクトルから dihydroxybenzbromarone, 6'-hydroxylbenzbromarone, 1'-hydroxylbenzbromarone, 1'-ketobenzbromarone と推定される代謝物が検出された (Fig. 4). 一方, MS クロマトグラムから,

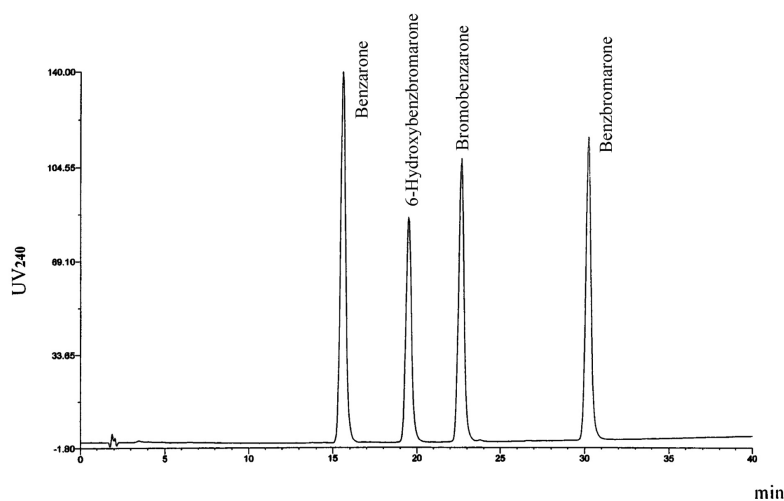


Fig. 3-1. HPLC profile of synthetic metabolites.

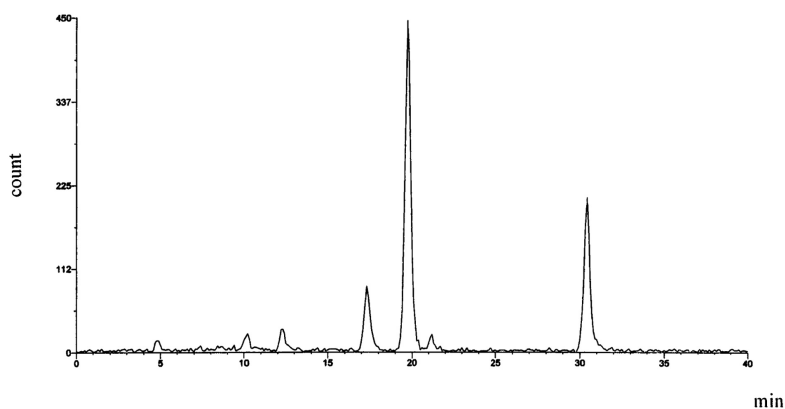


Fig. 3-2. Radio-HPLC profile of incubation mixture of 14 C-benzbromarone with human liver S9.

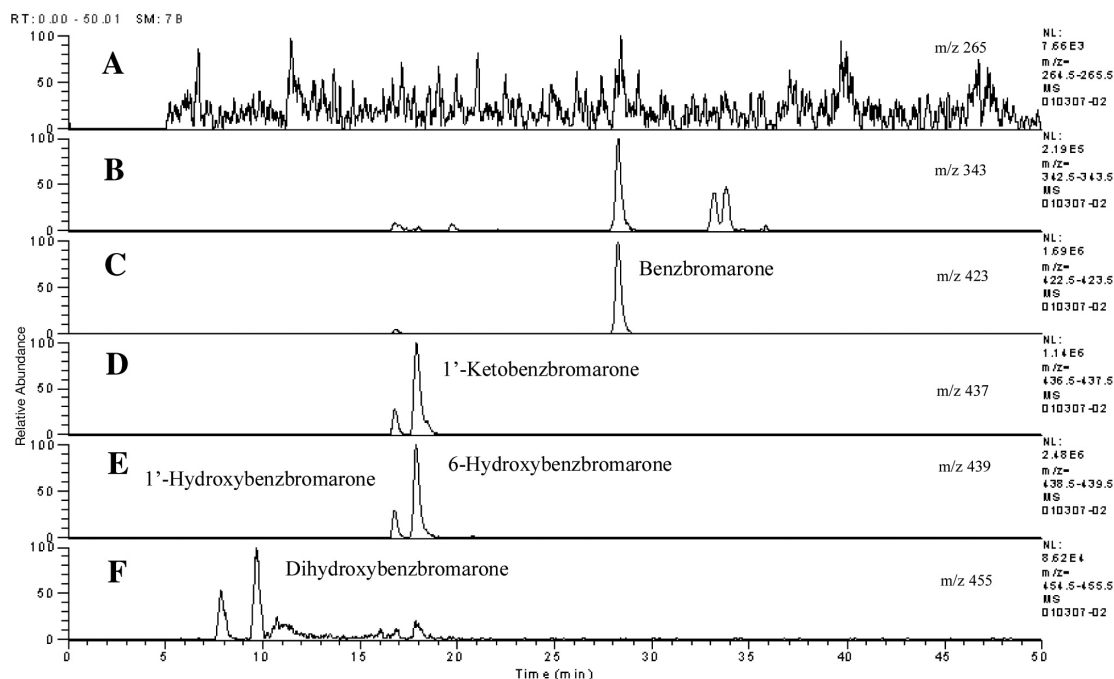


Fig. 4. APCI(-) LC/MS chromatograms of incubation mixture of ^{14}C -benzbromarone with human liver S9. A: Benzarone, B: Bromobenzarone, C: Benzbromarone, D: 1'-Ketobenzbromarone, E: 1'-Hydroxybenzbromarone and 6-Hydroxybenzbromarone, F: Dihydroxybenzbromarone.

BenzaroneおよびBromobenzaroneの保持時間にピークは認められなかった。

1-2. ヒトP450分子種の推定試験 (Fig. 5)

^{14}C -Benzbromarone (最終濃度 $5\ \mu\text{M}$) をヒトP450発現系ミクロゾーム (CYP1A2, 2C9*1, 2C9*2, 2C19, 2D6*1, 2E1, 3A4, 4A11) 中で60分インキュベートし、Benzbromaroneの代謝に関与するP450分子種の推定を行った。その結果、CYP1A2, 2C9*1, 2C9*2, 2C19, 2D6*1, 2E1, 3A4および4A11の各分子種での ^{14}C -Benzbromaroneの割合はそれぞれ85.0, 16.0, 72.1, 84.3, 84.8, 83.9, 85.7および81.4%であり、CYP2C9*1および2C9*2による代謝が認められた。また、CYP2C9*1および2C9*2による主な代謝物として6-Hydroxybenzbromaroneが認められ、その割合は60.6および11.4%であった。他の代謝物の生成はほとんど認められなかった。

1-3. ヒトP450分子種に対する酵素阻害作用 (Fig. 6)

ヒト肝ミクロゾームを用い、各ヒトP450分子種 (CYP1A, CYP2C8/9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP4A11) に対するBenzbromaroneの阻害作用について検討した。その結果、Benzbromaroneの濃度を1, 10および $100\ \mu\text{M}$ とした際のCYP1Aのモデル基質であるEthoxyresorufin代謝に対する阻害率はそれぞれ62.4, 84.8および12.4%であった。同

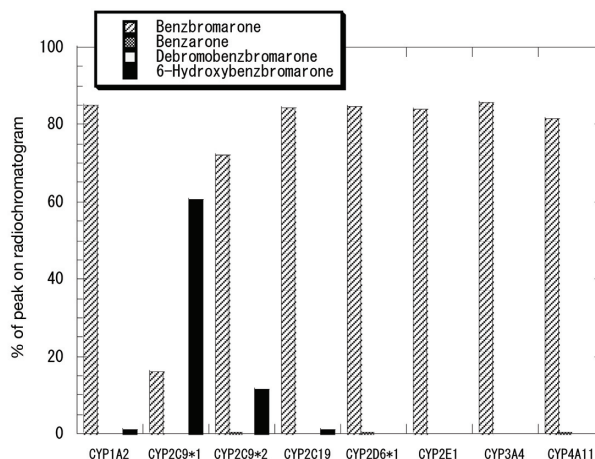


Fig. 5. Composition of Benzbromarone and its metabolites in incubation mixture of ^{14}C -Benzobromarone with cDNA-expressed human P450 enzymes prepared from B-lymphoblastoid cell lines (initial concentration of ^{14}C -Benzobromarone; $5\ \mu\text{M}$).

様に、CYP2C8/9のモデル基質であるTolbutamide代謝に対する阻害率はそれぞれ64.5, 86.2および100%であり、CYP2C19のモデル基質であるS-(+)-Mephenytoin代謝に対する阻害率はそれぞれ1.4, 9.4および76.0%であった。また、CYP2D6のモデル基質である(±)-Bufuralol代謝に対する阻害率はそれぞれ0.5, 2.0および12.1%であり、CYP2E1のモデル基質であるChlorzoxazone代謝に対する阻害率は1.7, 0.6

および28.0%であり, CYP3A4のモデル基質である Testosterone代謝に対する阻害率はそれぞれ0.4, 58.4 および98.2%であった. さらにCYP4A11のモデル基質である ^{14}C -Lauric acid代謝に対する阻害率はそれぞれ25.8, 23.2および29.1%であった. 以上の結果から, BenzbromaroneはCYP2C8/9, CYP2C19およびCYP3A4に対し阻害作用を示し, CYP1A, CYP2D6, CYP2E1, CYP4A11に対しては阻害作用をほとんど示さなかった.

2-1. PPAR α および γ の活性化能に対する検討 (Fig. 7)

Benzbromarone の PPAR α および γ に対するリガンド親和性をレポータージーンアッセイを用いて検討した. その結果, Benzbromarone は PPAR α に対し, 100 μM で Clofibric acid とほぼ同程度の活性化能を示した. PPAR γ に対しても, 100 μM で活性化能を示したが, troglitazone に比較し, 弱いものであった.

2-2. PPAR α および γ のタンパク発現レベルに対する検討 (Fig. 8)

Benzbromarone の PPAR α および γ のタンパク発現レベルに対する作用を Western blot を用いて検討した. その結果, Benzbromarone は, 10 μM で PPAR α のタンパク発現レベルの増加を示した. PPAR γ に対しても, 10 μM でタンパク発現レベルの増加を示したが, PPAR α と比較すると弱いものであった. また, Benzbromarone 添加による細胞数の増加は認められなかった.

考 察

Benzbromarone (Urinorm[®]) は痛風治療薬として20年以上にわたり広く安全に使用されている薬剤であるが, 近年, 副作用として, 肝機能障害が報告されるようになってきた. Benzbromaroneはその代謝産物および薬理作用の機序がいまだ完全には解明されていないことから, 我々は肝障害との関係を解明するため, 薬物代謝的および薬理学的観点から検討を行った.

我々はまず, ヒト肝S9を用いてLC/MSにより Benzbromaroneの代謝産物の構造を同定した. その結果, Benzbromaroneのヒト肝S9代謝物として, 2種のヒドロキシ体, 2種のモノヒドロキシ体, 1'-ケトン体の5種が推定された. ジヒドロキシ体の水酸化位置については, そのMSスペクトルから, 脱水イオンが認められず, ベンゾフラン環の水酸化が考えられた. また, 2種のモノヒドロキシ体のうち, ひとつは標品6-ヒドロキシ体と保持時間およびMSスペクトルが一致し, 他方は脱水イオンが認められたことより1'-ヒドロキシ体であると考えられた. さらに, モノヒドロキシ体より-2 muの代謝物が認められ, 1'-ヒドロキシ体がさらに酸化された1'-ケトン体であると推察した. こ

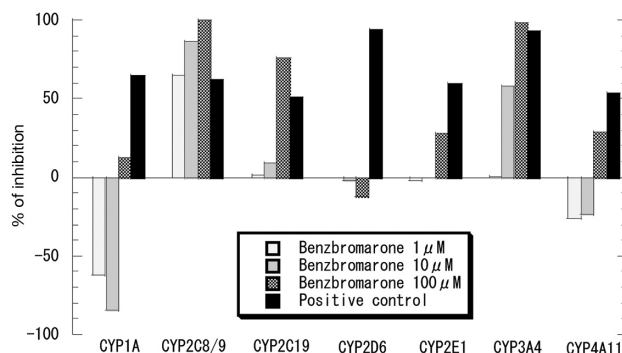


Fig. 6. Inhibition of each P450 model substrate metabolism in human liver microsomes treated with Benzbromarone and each positive control. Concentration of positive control: α -Naphthoflavone (1 μM), CYP2C8/9: Sulfaphenazole (3 μM), CYP2C.

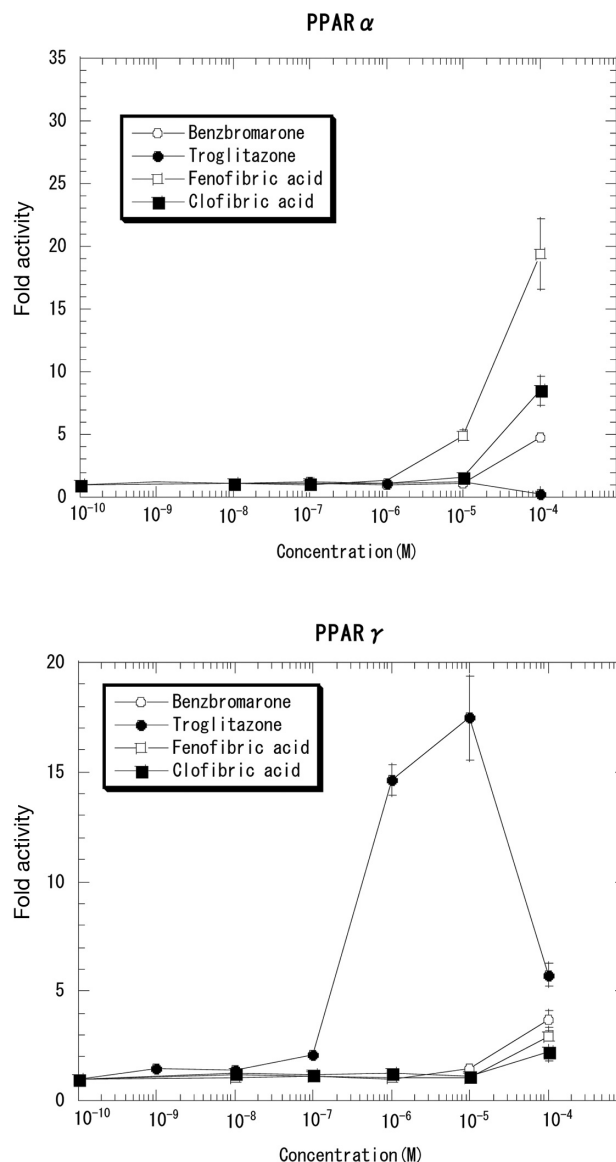


Fig. 7. PPAR α and PPAR γ reporter gene assay of test drugs. (Mean $\pm$ S.D., N=3)

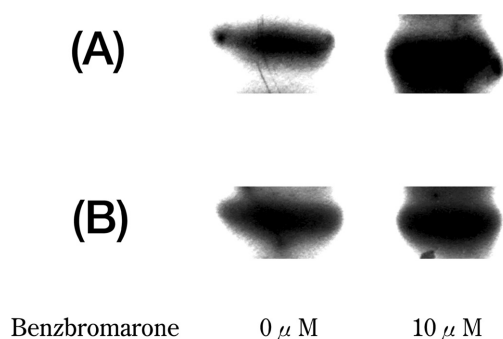


Fig. 8. The expression levels of (A) PPAR α protein and (B) PPAR γ protein by Western blot analysis in nuclear extracts of human kidney 293T cells treated with or without Benzbromarone for 24 hr.

れまで、Benzbromaroneの代謝産物として、脱ブロム体であるBenzaroneおよびBromobenzaroneが報告されており、Benzbromaroneによる肝障害発症の原因は代謝産物であるBenzaroneに起因する可能性があると考えられていた。しかしながら、今回の我々の研究結果より、Benzbromaroneの代謝産物としてBenzaroneおよびBromobenzaroneは検出されなかった。また、我々は成人健康男子におけるin vivo試験で、その血漿中および尿中にBenzaroneおよびBromobenzaroneは検出されなかったことを確認しており(現在投稿中)、これらのことから、Benzbromaroneによる肝障害発現機序はBenzaroneに起因するものではないことが明らかとなった。

次にヒトP450発現系マイクロゾームを用いてBenzbromaroneの代謝に関わるCYP分子種を同定した。その結果、BenzbromaroneはCYP2C9*1および2C9*2により代謝され、その主な代謝物としては6-Hydroxybenzbromaroneが認められた(Fig. 5)。また、ヒトP450分子種に対するBenzbromaroneの阻害作用について検討した結果、Benzbromaroneは特にCYP2C8/9に対して強い阻害作用を示し、CYP2C19に対しても阻害作用を示した(Fig. 6)。このことから、BenzbromaroneはCYP2C群であるCYP2C9により代謝され、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19およびCYP3A4を阻害することが明らかとなった。チトクロームP450は重要な薬物代謝酵素であり、物質の極性化を通じて薬物の体外への排泄を促す役割を担っている。CYPはヒトの薬物代謝に関わるものだけで20種類以上の分子種の存在が知られているが、そのうちCYP2C19、CYP2D6およびCYP2C9には遺伝的多型(single nucleotide polymorphism; SNP)が存在し、これらの分子種の活性がほとんどないpoor metabolizer、あるいは減少しているintermediate metabolizerが存

在する¹¹⁾。これらの遺伝多型では本来の酵素活性が減弱したり消失したりすることでP450による解毒代謝が進まず、毒性・副作用あるいは薬効の効きすぎなどの影響が現れることから、近年では個人個人のP450多型をDNA診断により調べ、テーラーメイド的な薬剤の服用による疾患治療が可能であり、かつ必要であると考えられている。Benzbromaroneの代謝およびBenzbromaroneにより阻害されるCYP2C9はヒト肝における総P450の約20%を占め、フェニトイン、トルブタミド、ワルファリン等の代謝に高い活性を有している。その多型としては2C9*2、2C9*3の2種類の多型が知られているが、日本人で検出された変異は2C9*3のみでありその頻度は2.1%であるが、ほとんどが*1(Wild)とのヘテロ接合体(*1/*3)であり、臨床的に問題とされるホモタイプ(*3/*3)は0.0441%と推定される¹¹⁾。現段階では、このCYP2C9のSNPとBenzbromaroneの代謝および肝障害に対する影響について本格的な臨床調査は行っていないが、Benzbromaroneの代謝に関わるCYP分子種がほぼCYP2C9のみであったという今回の結果を考えると、CYP2C9のpoor metabolizerおよびintermediate metabolizerにおいてBenzbromarone代謝になんらかの影響が現れ、副作用あるいは薬効の強化が発現する可能性が推察された。

我々はさらに、Benzbromaroneはperoxisome増殖剤であることが示唆されていることに注目し⁹⁾、BenzbromaroneのPPARサブタイプに対するリガンド親和性(活性化能)について検討した。その結果、BenzbromaroneはPPAR α に対し、100 μ Mで活性化能を示した。事実、Benzbromaroneは、10 μ MでPPAR α のタンパク発現レベルの増加も示した(Fig. 8)。一方、PPAR γ に対しても、わずかながら活性化能を示したが、troglitazoneに比較し、弱いものであった(Fig. 7)。これらの結果から、BenzbromaroneはPPAR α のリガンドであることが確認された。

最近、CYP分子種のCYP2C群の一つであるCYP2C19の上流のプロモーターに、PPARが結合するPPAR response element (PPRE)の存在が報告されている¹⁰⁾。PPREには、PPAR α およびPPAR γ がともに結合することが報告されているが、BenzbromaroneのPPARサブタイプに対するリガンド親和性(活性化能)の違いが、CYP分子種、特に、CYP2C群への酵素誘導の変化をもたらしたと考えられる。

今後は、薬剤性肝障害の発症機序として肝細胞のアポトーシスが示唆されていることにも注目し⁷⁾、Benzbromaroneの肝細胞に対する影響をラットおよびヒトの正常肝細胞を用い、CYP分子種、特に、CYP2C群への酵素誘導の変化により、どのようにアポトーシスを制御するのか明らかにする予定としている。

結 論

BenzbromaroneはCYP2C9によって6-Hydroxy-benzbromaroneに代謝されることが確認された。また Benzbromarone は PPAR α のリガンドであることが発見された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導御校閲賜りました埼玉医科大学化学教室、菰田二一教授に深謝いたします。また、本研究に協力頂きました第四内科学佐藤さわ子実験助手に感謝いたします。

References

- 1) Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, HoCha S, et al. Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 2002;417:447-51.
- 2) Brockhuysen J, Pacco M, Sion R, Demeulenaere L, Van Hee M. Metabolism of Benzbromarone in man. *Europ. J Clin Pharmacol* 1972;4:125-30.
- 3) Hautekeete ML, Henson J, Naegels S, DeNeve A, Adler M, Deprez C, et al. Severe hepatotoxicity related to benzbromarone - a report of three cases with two fatalities. *Liver* 1995;15:25-9.
- 4) Walter-Sack I, DeVries JX, Ittensohn A, Kohlmeier M, Weber E. Benzbromarone disposition and uricosuric action-Evidence for hydroxylation instead of debromination to Benzarone. *Klin Wochenschr* 1988;66:160-6.
- 5) DeVries JX, Walter-Sack I, Voss A, Forster W, Ilisisteguipons P, Stoetzer F, et al. Metabolism of benzbromarone in man-structures of new oxidative metabolites, 6-hydroxy- and 1'-oxo-benzbromarone, and the enantioselective formation and elimination of 1'-hydroxybenzbromarone. *XENOBIOTICA* 1993;23:1435-50.
- 6) Walter-Sack I, DeVries JX, Ittensohn A, Raedsch R. Biliary excretion of Benzbromarone and its hydroxylated main metabolites in humans. *Eur J Med Res* 1998;3:45-9.
- 7) 横井 毅, 山本 優衣, 柴田 文佳, 鈴木 美紀恵, 島田 典招, 山木 光男, 他. トログリタゾンの代謝と肝細胞障害性の検討. *薬物動態* 2001;16: 145-50.
- 8) Inoue I, Hayashi K, Yagasaki F, Nakamura K, Matsunaga T, Xu H, et al. Apoptosis of endothelial cells may be mediated by genes of peroxisome proliferator-activated receptor γ 1 (PPAR γ) and PPAR α Genes. *J Atheroscler Thromb* 2003;10: 99-108.
- 9) Bichet N, Cahard D, Fabre G, Remandet B, Gouy D, Cano JP. Toxicological studies on a benzofuran derivative. III. Comparison of peroxisome proliferation in rat and human hepatocytes in primary culture. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;106:500-8.
- 10) Waxman DJ. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals : Central role of nuclear receptors CAR, RXR, and PPAR. *Arc Biochem Biophys* 1999;369:11-23.
- 11) 久保田 隆廣, 千葉 寛, 伊賀 立二. CYP2C19, CYP2D6, および CYP2C9 の遺伝子多型と人種差. *薬物動態* 2001;16:69-74.