

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11375

研究課題名(和文)ドーピング禁止薬クレンブテロールの代謝物同時定量法の確立と薬物動態モデルの構築

研究課題名(英文) Establishment of simultaneous quantitative determination method and pharmacokinetic model for anti-doping drug clenbuterol metabolites

研究代表者

内山 武人 (UCHIYAMA, Taketo)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：90261172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まずクレンブテロールの酸化代謝物の一つであるニトロ化体の化学合成法を試みた。逆合成解析を行い入手可能な安息香酸誘導体を出発物質として用いて検討をおこなった結果、5工程、総収率41%で目的とするニトロ化体へとグラムスケールで導くことができた。さらにキラルカラムを用いた合成中間体の光学分割法により、光学活性ニトロ化体および光学活性クレンブテロールの調製が可能であることも見出した。ラット肝ミクロソーム中のニトロ代謝化合物およびクレンブテロールの同時測定に適応可能な条件を見出すとともにアセトアミノフェンを用いたモデル実験により代謝物体内動態を予測することが可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療目的ではなく競技能力の向上を目的として摂取される薬物、いわゆるドーピング禁止薬の代謝物に関する知見は非常に乏しい。本研究では、気管支拡張薬として用いられる一方で、筋肉増強薬としてドーピング禁止薬に指定されているクレンブテロールとその代謝物に着目し研究を遂行した。本研究により得られた知見は、「うっかりドーピング」を含めたドーピング検査においてより正確な判定を可能とし、公正なスポーツを行うための活動に寄与できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to chemically synthesize the nitro derivative of clenbuterol, which is one of the oxidative metabolites. According to retrosynthetic analysis and investigation using benzoic acid derivatives as starting materials, we were able to synthesize the desired nitro derivative on a gram scale in 5 steps with a total yield of 41%. Also, we carried out optical resolution of the synthesized nitro derivative, clarified its absolute configuration, and succeeded in establishing a preparation to optically active clenbuterol. We found conditions applicable to the simultaneous measurement of nitro metabolite and clenbuterol in rat liver microsomes, and clarified that it is possible to predict the metabolite pharmacokinetics using a model experiment using acetaminophen.

研究分野：医薬品化学

キーワード：クレンブテロール 薬物代謝 薬物動態 アンチドーピング

1. 研究開始当初の背景

ドーピングとは、禁止物質(薬)の摂取によって競技者の能力を向上させる行為であり、スポーツの価値を貶める行為である。競技者の尿や血液試料からドーピング禁止物質(薬)を検出することにより、競技者のドーピング行為実施の有無を検出することが可能である。一方、薬物の多くは体内で薬物代謝酵素により酵素反応を受け、投与された薬物とは分子構造が異なる代謝物となる。血中薬物濃度の経時的推移や、尿中への排泄率などの薬物体内動態研究は、薬物がヒトに投与された際に、疾患の治療を目的とした薬効の把握のために行われてきた。これに対し、疾患の治療目的ではなく、競技能力向上を目的として摂取された際の投与量や、そのときの血中薬物濃度の知見は乏しい。

ドーピング行為には、競技能力向上を目的としたものではなく、競技者が意図せずドーピング禁止物質を摂取してしまう行為である「うっかりドーピング」がある。例えば、競技者が食事により摂取した牛肉等にドーピング禁止物質が含まれている場合が考えられることから、「うっかりドーピング」と、競技能力向上を目的としたドーピング行為とを識別する科学的な方法が求められている。

2. 研究の目的

アスリートが禁止薬を「故意」に摂取したのか、あるいは「うっかり」して摂取したのかを正しく判断する際に、代謝物に関する情報を的確に分析することは大きな意味を持つ。「うっかりドーピング」による単回の禁止物質の摂取と、競技能力向上を目的として日常的に禁止物質を摂取した場合は、禁止物質およびその代謝物の血中濃度および尿中濃度は異なることが推測されることから、薬物の血中濃度および尿中排泄速度に関する薬物動態モデルを構築することにより、血中薬物濃度の経時的推移を予測することが可能である。本研究では、気管支拡張薬として用いられる一方で、筋肉増強薬としてドーピング禁止薬に指定されているクレンプテロールとその代謝物に着目する。クレンプテロールは古くから使われている薬剤であるにも関わらず、代謝物血中濃度の経時的変化についてはほとんど解明されておらず、クレンプテロールの代謝反応機構および関与する酵素に関しても詳細は明らかにされていない。したがってクレンプテロール代謝物の時間推移を明らかにすることは、クレンプテロールの薬物動態を理解することに繋がり、本研究により得られた知見は、ドーピング検査においてより正確な判定を可能とし、公正なスポーツを行うための活動に寄与できるものと考えられる。

本研究では、まずドーピング禁止薬のモデル化合物としてクレンプテロールを対象とし、想定される代謝物の化合物ライブラリーを化学合成法により構築する。これまでクレンプテロール代謝物の合成法に関する報告はほとんどない。化学合成した代謝物を標品として、クレンプテロールおよび代謝物の生体試料中濃度同時測定系を確立する。この生体試料中濃度同時測定系を用い、ラット肝ミクロソームおよびヒト肝ミクロソームの *in vitro* による薬物代謝実験を行う。ラットを用いて、*in vivo* によるクレンプテロールおよびその代謝物の生体試料中濃度の経時的推移についても検討する。代謝実験により得られたデータを基に生理学的薬物動態モデルを構築し、ヒトの体内薬物動態を過去にさかのぼって推測することで、「意図的」なドーピングと「うっかり」ドーピングの識別方法を検証することが本研究の最終的な目標である。

3. 研究の方法

(1) クレンプテロール代謝物の合成

4-アミノ-3,5-ジクロロ安息香酸を出発物質として、ヒトにおける代謝物の候補であるニトロ化合物ならびにヒドロキシアミン化合物へ化学合成法を確立する。代謝化合物ライブラリーの充実に資するため、クレンプテロールの不斉炭素に着目した光学異性体の調製と絶対立体配置の決定を行う。クレンプテロールの立体化学と代謝物の関係を明らかにすることは、ドーピング検査のみならず、医薬品としてより良い治療を患者に提供する上でも重要である。

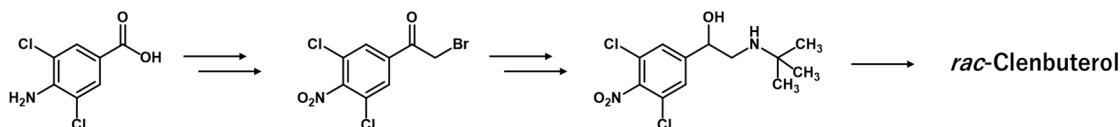
(2) クレンプテロールおよび代謝物の同時定量法・薬物動態モデルの構築

ラットおよびヒト肝ミクロソームを用い薬物代謝実験をおこない、クレンプテロール新規代謝物を探索する。化学合成により得られた代謝サンプル化合物を標準品として用い、ラット血漿、肝ミクロソーム、ヒト肝ミクロソーム中の代謝物濃度同時測定系を構築する。ラット血中におけるクレンプテロールと代謝物濃度の経時的推移、尿中排泄速度データ、代謝酵素の速度論的データを用いて生理学的薬物動態モデルを確立する。最終的に、本研究において得られたヒト肝ミクロソーム等の実験データおよびクレンプテロール血中濃度経時的推移の文献データを活用し、メタ解析を行うことによりヒト体内動態の推測と予測精度の向上を図る。

4. 研究成果

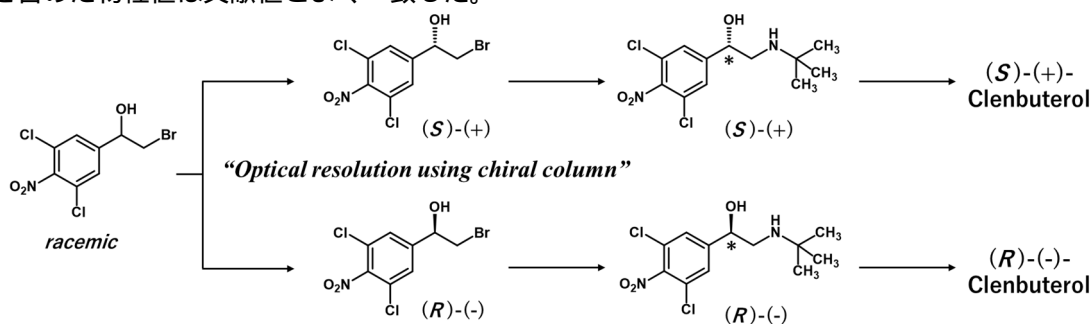
クレンプテロール代謝物の化学合成法に関する報告はほとんどない。本研究では代謝物の一つと想定されているニトロ誘導体の大量合成法の確立を試みた。まず、市販クレンプテロールを

用いて、芳香族アミンを選択的かつ化学的に直接酸化する方法を種々検討したが、目的とするニトロ誘導体を得ることはできなかった。そこで、逆合成解析をおこない、入手可能な安息香酸誘導体を出発物質として用いて検討をおこなった結果、5工程、総収率41%で目的とするニトロ誘導体へと導くことができた。本合成方法はグラムスケールでの合成が可能であることを確認している。また、ニトロ誘導体のニトロ基を選択的に還元することでクレンプテロールへの変換が可能であることも見出した。



検討課題であったヒドロキシルアミン体への誘導を様々試みたが、その不安定さ故に目的物を得ることができなかった。

市販薬であるクレンプテロールは不斉炭素原子を一つ有しており、医療現場ではラセミ体として用いられている。そこで、合成可能となったニトロ誘導体について光学異性体の調製を試みたところ、合成前駆体であるプロモヒドリンについてキラルカラムによる光学分割をおこなうことで、光学純度がほぼ100%なニトロ誘導体の調製が可能であることを明らかにした。さらに、その絶対立体配置についても新 Mosher 法とX線結晶構造解析により決定することができた。また、光学活性なニトロ誘導体を還元することで得られたクレンプテロール光学活性体の旋光度を含めた物性値は文献値とよく一致した。



一方、合成代謝物を用いてクレンプテロールと同時に測定分析できる LC-MS/MS の条件検討をおこなった結果、得られた測定条件は、ラット肝ミクロソーム中のニトロ誘導体およびクレンプテロールの同時測定にも適応可能であることが明らかとなった。さらに代謝物の体内動態情報が報告されているアセトアミノフェンをモデル化合物とし、薬物およびその代謝物の体内動態予測法を検討した。アセトアミノフェン体内動態情報およびその代謝物の構造式情報に加え、アセトアミノフェンを基質とした in vitro 代謝実験結果を利用することにより代謝物体内動態を予測することが可能であった。

以上の知見は、「意図的」なドーピングと「うっかり」ドーピングをより明確に識別するための検査法確立の礎となるものである。現在、本研究により大量合成が可能となった合成中間体を用いてグルクロン酸抱合体の合成を試みており、クレンプテロール代謝物ライブラリーの拡充を図っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 里沙、森 彩華、持田 麻美子、齋藤 弘明、宮本 葵、青山 隆彦、松本 宜明、内山 武人
2. 発表標題 光学活性クレンプテロールと代謝物の化学的合成
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 持田麻美子、高橋里沙、齋藤弘明、宮本葵、青山隆彦、松本宜明、内山武人
2. 発表標題 クレンプテロール代謝物の合成研究
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮本 葵 (Miyamoto Aoi) (20513914)	日本大学・薬学部・講師 (32665)	
研究分担者	青山 隆彦 (Aoyama Takahiko) (70384633)	日本大学・薬学部・准教授 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------