

抗レトロウイルス薬 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine (D4T) およびそのエステルプロドラッグの経皮吸収性

川口健夫^{*1,*2)}, 長谷川哲也・遠藤浩孝・関 俊暢・從二和彦^{*2)}, 実吉峯郎^{*3)}

Percutaneous penetration of 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine (D4T) and its ester prodrugs through rat skin

In an attempt to develop a transdermal therapeutic system for 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine (D4T) and its lipophilic prodrugs, percutaneous penetration of the drugs was examined in rat skin.

The ability of penetration enhancers (Azone and *l*-menthol) to increase transdermal delivery of the drugs was evaluated in excised rat skin. Azone and *l*-menthol showed a significant enhancing effect on the penetration of D4T and its 5'-acetate (C2-D4T) at a concentration of 3% in water. The penetration of 5'-octanoate (C8-D4T) was, however, hardly observed even in the presence of the enhancers. A D4T suspension containing *l*-menthol (3%) was applied on rat abdominal skin, and the plasma concentration was measured. D4T was detected in plasma at 12 hours after the application, and a constant plasma concentration (1-3 μ M) was maintained for 8 hours.

Takeo Kawaguchi^{*1,*2)}, Tetsuya Hasegawa・
Hirotaka Endoh・Toshinobu Seki・
Kazuhiko Juni^{*2)}, Mineo Saneyoshi^{*3)}

key words: 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine,
D4T, percutaneous penetration, AIDS

後天性免疫不全症候群(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)の本質的原因ウイルスである HIV(human immunodeficiency virus)は、レトロウイルスに属し、その増殖過程で特徴

的な RNA から DNA への転写(逆転写)を行う。この逆転写過程には、レトロウイルスに特有の DNA ポリメラーゼである逆転写酵素が関与しており、この逆転写酵素は抗レトロウイルス薬の標的となる。

逆転写酵素阻害を作用機作とする抗レトロウイルス薬としては、thymidine アナログの zidovudine(azidothymidine, AZT)が AIDS 治療に使用されて有効性が確認されているのをはじめ、同じく thymidine アナログの 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine(D4T)や deoxyinosine アナログの 2',3'-dideoxyinosine(DDI)の評価が進められている。

これらの核酸アナログは、いずれも細胞中でリン酸化されたあと、正常なデオキシヌクレオチドと競合して、逆転写酵素を阻害する代謝拮抗型の薬物で、したがって、その作用はウイルス感染細胞への薬物の接触濃度よりも、むしろ接触時間に依存する、時間依存型薬物と考えられる。

一方、経皮吸収型製剤は比較的に少ない投与回数で安定した血中濃度が得られる剤形として、冠血管拡張薬などの製剤がすでに臨床使用されており、24 時間以上にわたってほぼ一定の血中濃度を維持しうることが確認されている。このような全身作用を目的とした経皮吸収型製剤の特性は、長時間標的細胞に薬物を接触させることが求められる時間依存型薬物の投与剤形として有望である。

筆者らは、すでに zidovudine およびその脂溶性誘導体の皮膚透過性について検討し、臨床応用の可能性について報告してきた^{1,2)}。本報では HIV の逆転写酵素に対して zidovudine よりも高い選択性を示すとされる 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine(D4T)およびそのエステル誘導体³⁾の

^{*1)} Life Science Research Center, Josai University, Sakado Saitama 城西大学生命科学研究センター

^{*2)} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado Saitama 城西大学薬学部薬理学教室

^{*3)} Department of Biological Science, The Nishi-Tokyo University, Kitatsuru-gun, Yamanashi 西東京科学大学理工学部バイオサイエンス学科

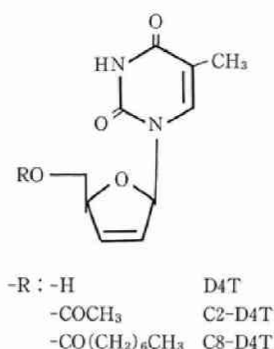


図1 D4T およびその誘導体の化学構造

皮膚透過性と経皮吸収型製剤の開発の可能性について検討した

材料と方法

(1) 化合物の合成

D4T は市販の thymidine を原料に Horwitz らの方法⁴⁾に準じて合成した。D4T のエステル化は、pyridine 中 N,N-dimethylaminopyridine を触媒として酸無水物を用いて行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで目的物を分離・精製した。合成した化合物はいずれも NMR, MS, 元素分析の結果が構造を支持し、HPLC による分析で単一ピークを得た。

図1にD4Tとその誘導体の化学構造を示す。

(2) 静注および経口投与後のラット血中濃度

ネブタール麻酔下、雄性ウイスターラット (250~280 g) に頸動脈カニューレーションを施した。手術後 12 時間絶食させ、覚醒下 D4T 10 mg/kg を尾静脈および胃内に投与した。

投与後ラットを Bollman ケージに固定し、経時的に 0.5 ml の血液を採取した。遠心分離で得たプラズマ中の D4T を内部標準物質 1-(2'-deoxy-3', 5'-epoxy- β -D-threo-pentofuranosyl) thymine (thymidine oxetane) を含有する酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を分取し、窒素気流により酢酸エチルを留去した。残渣をアセトニトリル (0.1 ml) に溶解し、逆相 HPLC カラムで分離、紫外吸光 (265 nm) 検出器によって定量した。

(3) ラット皮膚透過実験

雄性ウイスターラットの腹部皮膚を除毛後，麻酔下に皮膚を摘出した．有効透過面積 0.95 cm^2 の

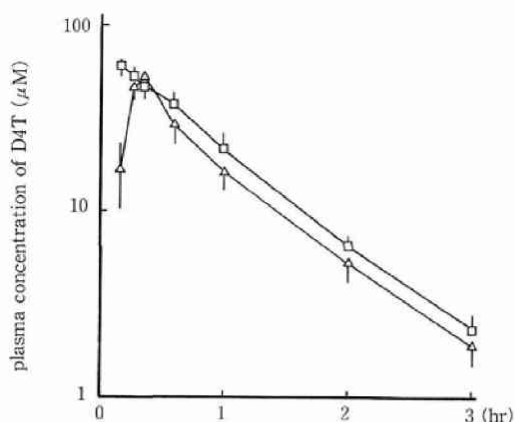


図 2 経口および静脈内投与後のラット血中濃度
△：経口 □：静脈内

縦型拡散セルに摘出皮膚を装着し、receptor 側に生理食塩液、donor 側に薬物の水性懸濁液を注入して、37°Cで receptor 側をマグネティックスターラーで攪拌した。経時的に receptor 側よりサンプリングし、サンプル中の薬物濃度を HPLC によって定量した。

(4) 経皮投与後のラット血中濃度

雄性ウィスターラットを背位固定し、腹部を除毛後、有効面積 3.2 cm^2 のガラスセルを接着剤(アロンアルファ)を用いて腹部に密着させた。セル内に薬物の水性懸濁液を投与し、経時的に鎖骨下静脈より採血(0.5 ml)した。プラズマ中薬物濃度を上述(2)と同様に HPLC で定量した。

(5) HPLC 測定条件

HPLCによる化合物の分析には、つぎの溶出液を流速 1.0 ml/min で用いた。D4T; H₂O: MeOH: AcOH (85: 15: 0.2), C2-D4T; H₂O: MeOH: AcOH (70: 30: 0.2), C8-D4T; H₂O: MeCN: AcOH (30: 70: 0.2)。

結果と考察

経皮投与型製剤を設計するための基礎実験として、D4Tをラットに静脈内および経口投与(10 mg/kg)後の血中薬物濃度変化を測定した(図2)。

D4T の静脈内投与時の生物学的半減期は 35.9 分と短く、経口投与時の T_{\max} は 15 分、絶対的バイオアベイラビリティは 72.6%であった。この結果は、持続静注以外の通常の投与方法では、

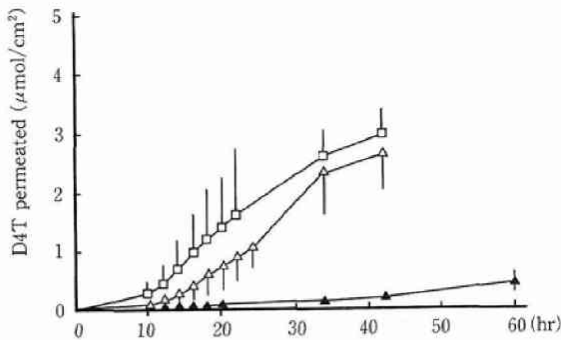


図3 D4Tのラット皮膚透過性

▲：水、△：3%-Azone、□：3%-*l*-menthol

D4T の血中濃度を長時間安定に保つことは困難であることを示している。

D4T の皮膚透過性と透過促進剤の影響について、ラット腹部摘出皮膚を用いて検討した(図3)。D4T の水性懸濁液(溶解度 13.4 mg/ml, 40°C)からのラット皮膚透過には約10時間のラグタイムが観察され、その後 $7 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{cm}^2 \cdot \text{hr}$ 前後の透過(22~34時間の平均)が認められた。皮膚透過促進効果が報告されている Azone^{5,6)} および *l*-menthol⁷⁾ を3%添加することで D4T の皮膚透過(flux)は22~34時間の平均で、それぞれ10.9および17.7倍促進された。

D4T の摘出皮膚透過を促進した *l*-menthol 3%を含有する D4T 水性懸濁液をラットの腹部に適用し、血中 D4T 濃度を測定した(図4)。*in vitro* の結果を反映して、適用後血中に D4T を検出するまでに約10時間を要したが、12時間目には最高血中濃度 3.66 μM を示し、その後8時間にわたって 1 μM 以上の濃度を持続した。

ラットの実験結果から臨床応用の可能性を考えるには距離があるが、*in vitro* における D4T の HIV 増殖阻害濃度⁸⁾ (0.5~1 μM) 以上を8時間以上維持したことは、D4T の経皮投与型製剤の開発の可能性を示唆したと考える。

D4T の糖部5位をアシル化した誘導体について、誘導体の物理化学的性質とラット皮膚透過性について検討した。実験に用いた誘導体2種と D4T の物理化学的性質を表1に示す。

acetate(C2-D4T)、octanoate(C8-D4T)ともに D4T と比較してクロロホルム-水間の分配率が向上したが、融点の低下は得られず、水溶性は分

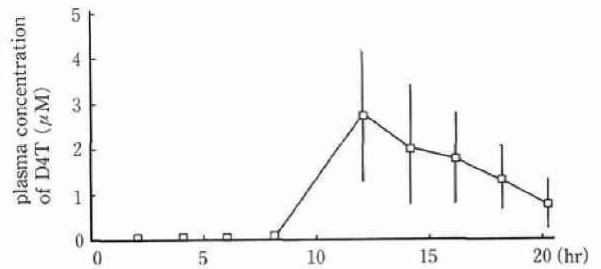
図4 *l*-menthol 3%含有 D4T 水性懸濁液適用後のラット血中濃度

表1 D4T およびエステル誘導体の物理化学的性質

	融点 (°C)	分配係数 ^{*1)} (log P)	溶解度 ^{*2)} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
D4T	167	-1.54	13360
C2-D4T	189	0.92	7510
C8-D4T	154	2.92	5.84

*1) クロロホルム：水、25°C

*2) 水、40°C

配率の上昇に伴って低下した。C2-D4T および C8-D4T の中性懸濁液からのラット腹部摘出皮膚透過性を D4T と同様に測定した(図5, 6)。いずれの誘導体も単独ではほとんど皮膚透過が観察されず、透過促進剤の添加を必要とした。C2-D4T の皮膚透過は Azone および *l*-menthol を3%添加することで、それぞれ0.25および0.02 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2 \cdot \text{hr}$ (22~34時間の平均 flux) に促進されたが、C8-D4T の透過は *l*-menthol の添加では促進されず、Azone の添加によってわずかに透過が観察された。また、C2-D4T ではエステル誘導体として透過する量が総透過量の30~50%を占めたのに対して、C8-D4T ではエステル体としての透過は観察されず、先に報告したこれらエステル誘導体の酵素的加水分解反応性⁹⁾を裏付ける結果となった。

zidovudine をはじめ今回検討した D4T など 2',3'-dideoxynucleoside 類には逆転写酵素阻害活性を示すものが多く、AIDS 治療薬として有望視されている。しかし、これらの化合物はウイルスの逆転写酵素だけでなく、宿主の DNA ポリメラーゼも阻害することが報告されており⁸⁾、このことが臨床における骨髄障害などの重篤な副作用の原因になっていると考えられている。D4T のよ

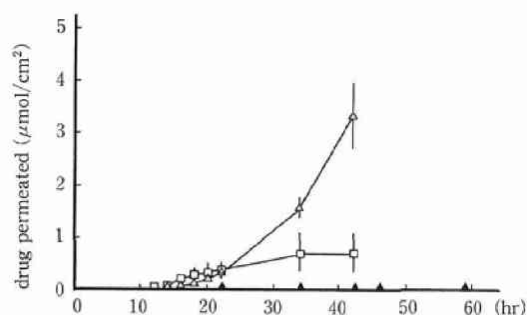


図5 C2-D4Tのラット皮膚透過性

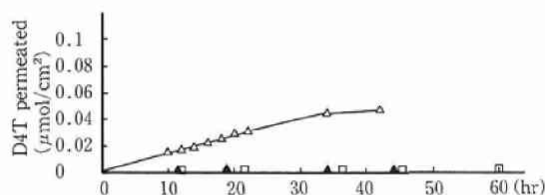
▲：水、△：3%-Azone、□：3%-*l*-menthol

図6 C8-D4Tのラット皮膚透過性

▲：水、△：3%-Azone、□：3%-*l*-menthol

うな時間依存型薬物で、しかもウイルス感染細胞と宿主細胞に対する選択性に問題を有する薬物の至適投与方法を考える場合、生体内薬物濃度を標的酵素は阻害するが、宿主酵素は致死的には阻害しない濃度に、できるだけ長時間制御することが重要と考えられる。経皮吸収型製剤は少ない投与回数で長時間血中薬物濃度を制御するのにすぐれた製剤であるが、一般に皮膚の薬物透過性が低いことから、投与量の多い薬物の全身作用性の製剤を設計するのは困難な場合が多い。

本報では、D4T 経皮吸収型製剤の開発の可能性を検討することを目的として、基礎的実験を行い、D4T の皮膚透過には *l*-menthol が、また D4T の脂溶性エステル誘導体である C2-D4T の透過促進には Azone が有効であることが示された。ま

た、ラットを用いた *in vivo* 実験結果は適当な吸収促進剤の存在下に、臨床効果の期待できる血中濃度が得られることを示した。

本研究の要旨は、第6回日本 DDS 学会(長崎)で発表した。本研究費の一部は、文部省科学研究費補助金によるものである。

文 献

- 1) Seki, T., Kawaguchi, T., Sugibayashi, K., Juni, K., Morimoto, Y.: Percutaneous absorption of azidothymidine in rats. *Int. J. Pharm.* 57: 73-75, 1989.
- 2) Seki, T., Kawaguchi, T., Juni, K., Sugibayashi, K., Morimoto, Y. et al.: Enhanced transdermal delivery of Zidovudine in rats and human skin. *Chem. Pharm. Bull.* (in press).
- 3) Kawaguchi, T., Hasegawa, T., Seki, T., Juni, K., Saneyoshi, M.: Ester prodrugs of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine (D4T). *Int. J. Pharm.* 58: R1-3, 1990.
- 4) Horwitz, J. P., Chua, J., Da Rooge, M. A., Noel, M., Klundt, I. L.: Nucleosides. IX. The formation of 2',3'-unsaturated pyrimidine nucleosides via a novel β -elimination reaction. *J. Org. Chem.* 31: 205-221, 1966.
- 5) Stoughton, R. B., McClure, W. O.: AZONE: a new non-toxic enhancer of cutaneous penetration. *Drug Develop. Indust. Pharm.* 9: 725-744, 1983.
- 6) Stoughton, R. B.: Enhanced percutaneous penetration with 1-dodecylazacycloheptan-2-one. *Arch. Dermatol.* 118: 474-477, 1982.
- 7) Okabe, H., Takayama, K., Ogura, A., Nagai, T.: Effect of limonene and related compounds on the percutaneous absorption of indomethacin. *Drug Design Delivery* 4: 313-321, 1989.
- 8) Inoue, T., Tsushita, K., Saneyoshi, M., Tomoda, Y., Nagai, Y. et al.: *In vitro* bone marrow toxicity of nucleoside analogs against human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 576-579, 1989.