

● dGSH を用いた反応性代謝物の高速スクリーニング

TN415

Rapid Screening of Reactive Metabolites Using Dansyl Glutathione

【概要】

特異体質性薬物毒性の発現機構のひとつに、薬物の代謝により生成する反応性代謝物の関与が知られています。近年、製薬企業では探索段階から毒性回避に向け、スクリーニング化合物について放射性標識体の合成を必要としない反応性代謝物のトラッピング試験が実施されています^{1),2)}。しかし、非標識のグルタチオンを用いた定性的トラッピング試験では代謝活性化に関わる構造情報は得られる一方、その定量的情報の取得は困難でした。当社ではダンシル基で蛍光標識したグルタチオン（以下、dGSH）をトラップ剤として用い、蛍光強度を指標に dGSH 付加体の生成量から反応性代謝物を半定量的に評価する方法を採用しております³⁾。以下、当社での Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC[®]) を活用した dGSH トラッピングアッセイの実施例を示します。

【実施例 1】 UPLC[®]-蛍光分析による反応性代謝物の半定量評価

反応性代謝物の生成が知られている Troglitazone, Clozapine および Diclofenac を例に用いて、dGSH トラッピング試験³⁾を実施しました。各化合物について dGSH 存在下で肝ミクロソームによる代謝反応を行い、各反応試料を UPLC[®]-蛍光検出器にて分析しました。結果を図 1 に示します。補酵素である NADPH を添加しなかった未反応群（青線）と比較し、NADPH を添加した反応群（赤線）では dGSH 付加体と疑われる蛍光ピークをそれぞれの化合物で検出しました。また、蛍光強度補正を施して求めた各化合物の dGSH 付加体生成量についても図 1 に合わせて示します。当社では、UPLC[®]を用いることで 1 サンプルあたりおよそ 15 分の高速スクリーニング分析が可能です。

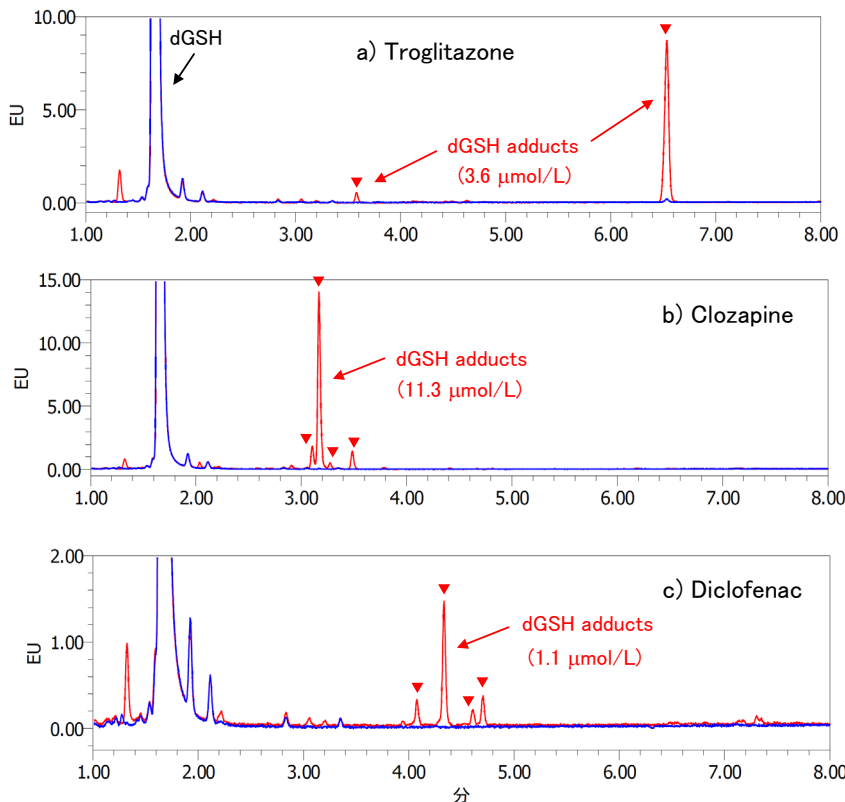


図 1. 代謝反応試料の蛍光クロマトグラム a) Troglitazone、b) Clozapine および c) Diclofenac

[実施例 2] UPLC[®]-MS/MS を用いた Precursor Ion Scan による反応性代謝物の定性評価

dGSH 付加体に特異的な Product ion である m/z 505 を指標に、ネガティブモードでの Precursor ion scan⁴⁾ を実施しました。図 2 に Troglitazone の保持時間 6.6 分に検出されたマススペクトルを示します。検出された m/z から、Troglitazone が酸化されて dGSH が一つ結合した付加体由来ピークであることが示唆されました⁵⁾。

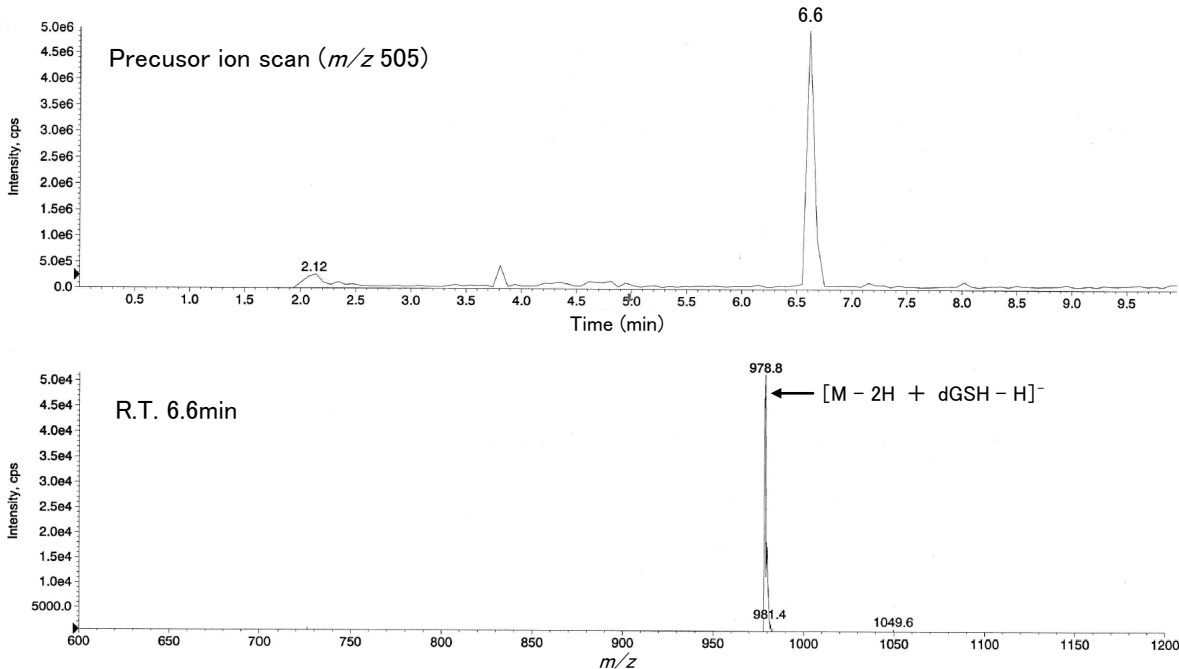


図 2. Troglitazone 代謝反応試料 (R.T.6.6 分) の Precursor ion scan (m/z 505) 結果

dGSH を用いたトラッピング試験では、反応性代謝物に関する定性・定量情報を合わせて取得することが可能です。当社では、蛍光検出と Precursor ion 検出を組み合わせることで、dGSH 付加体の有無をより高い精度で評価いたします。また、お客様のご要望に応じた試験デザインでの実施も承っておりますので、お気軽にご相談下さい。

[参考文献]

- 1) 日本薬理学雑誌 **127**, 473-480 (2006)
- 2) 日本薬理学雑誌 **134**, 338-341 (2009)
- 3) Chemical Research in Toxicology, **18**, 896-903 (2005)
- 4) Chemical Research in Toxicology, **18**, 630-638 (2005)

[関連技術リンク]

・ 反応性代謝物のトラッピングアッセイ

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn370.pdf>