

免疫抑制状態およびTDI投与によるI型アレルギー状態における有機リン系農薬(FTN)投与の影響を調べた。その結果、脾細胞培養上清中の総IgM濃度およびIL-10濃度に影響が認められ、複数の化学物質の複合作用によるアレルギーの増悪作用を捉えられる可能性が示唆された。その一方で、NCマウスをアレルゲン性物質であるOVAなどで感作した場合には定常的に測定値が得られていた総IgE濃度がすべて検出限界以下となった。総IgE濃度の変化は、アレルギーの増悪作用を経時的に捉えるための優れた指標であることから、アレルゲン性物質であるTDIの投与量や経路、投与スケジュールなどの検討がさらに必要であると思われる。逆に、DEX投与群では、免疫抑制作用がかなり強く表れ、複合作用が見えにくかった可能性も考えられた。複合投与の影響を検討していく上で、それぞれの投与経路や、投与時期などについても総合的に検討する必要を感じている。今後、これらの観点からの検討に加えて、種々の農薬や環境化学物質、食品成分などと、免疫系に直接作用する物質との複合投与を行って評価法のvalidationを行い、多くの化学物質の評価に役立てたい。

また、免疫抑制状態あるいはアレルギー状態の動物を用いて種々の化学物質の複合投与による影響を調べることと、*in vitro*アレルギーモデル系の構造活性相関の検討とを合わせて、臨床的にも有用な情報を提供したいと考えている。

【参考文献】1)Saito H., Ebisawa M., Tachimoto H., Shichijo M., Fukagawa K., Matsumoto K., Iikura Y., Awaji T., Tsujimoto G., Yanagida M., Uzumaki H., Takahashi G., Tsuji K. and Nakahata T. Selective growth of human mast cells induced by steel factor, IL-6, and prostaglandin E2 from cord blood mononuclear cells. *J. Immunol.* 157, 343-350, 1996

2) Sato T., Taguchi M., Nagase H., Kitoh H. and Niikawa M.: Augmentation of allergic reaction by several pesticides. *Toxicol.* 126, 41-53, 1998

E. 結論

有機リン系農薬(フェントエート、PAP)、含窒素系農薬(クロロニトロフェン、CNP)及びパラコートについて、ラット、マウス由来肥満細胞、並びに臍帯血由来ヒトマスト細胞からの脱顆粒反応への影響について検討した結果、10-100 μ g/mLのCNP、およびPAP 1mg/mLで、IgE感作されたマスト細胞の抗原刺激に伴う脱顆粒促進活性が観察された。一方、NC/Ngaマウスを用いた*in vivo*の実験では、デキサメサゾン(DEX)およびトルエンジイソシアネート(TDI)と有機リン系農薬(フェントロチオン、FTN)の複合の影響が脾細胞培養上清中の総IgM濃度およびIL-10濃度で認められた。

F. 発表論文

なし

G. 知的所有権の取得状況

該当せず

表 1 in vivo アレルギーモデル系の検討---群構成---

| 投与群： | po | topical | sc | 匹数 |
|---------------|--------|---------|--------|----|
| 1 Control | Saline | AOO | オリーブ油 | 5 |
| 2 FTN | Saline | AOO | FTN | 5 |
| 3 DEX | DEX | AOO | オリーブ油 | 5 |
| 4 DEX+FTN | DEX | AOO | FTN | 5 |
| 5 TDI | Saline | TDI | オリーブ油 | 4 |
| 6 TDI+FTN | Saline | TDI | FTN | 5 |
| 7 DEX+TDI | DEX | TDI | オリーブ油 | 5 |
| 8 DEX+TDI+FTN | DEX | TDI | FTN | 7 |
| | 5/week | 1/week | 1/week | 41 |

| 投与物質-媒体 | 用量 | 容量 | 濃度 (mg/ml) |
|------------------------------------|----------|------------|------------|
| フエニトロチオン(FTN)-オリーブ油 | 6 mg/kg | 0.1mL/10g | 0.6 |
| デキサメサゾン (DEX)-Saline | 0.5mg/kg | 0.1mL/10g | 0.05 |
| トリエンジイソシアネート(TDI)-アセトン・オリーブ油 (AOO) | | 50 μ L | 0.75 |

表 2 Effects of paraquat, CNP (p-nitrophenyl-2,4,6-trichlorophenol) and PAP (phenthoate) on the release of β -hexosaminidase from RBL-2H3 cells

| | μ g/ml | β -hexosaminidase release (%) | | | | |
|----------|------------|-------------------------------------|-------|-------|-----------|-------------|
| | | Antigen + | | | Antigen - | |
| Paraquat | 0.1 | 12.7 | \pm | 0.9 | - | |
| | 1.0 | 11.2 | \pm | 0.6 | 6.3 | \pm 1.3 |
| | 10.0 | 14.8 | \pm | 0.4 * | - | |
| | 100.0 | 11.1 | \pm | 1.2 | 6.2 | \pm 0.6 |
| CNP | 1.0 | 10 | \pm | 1.2 | 7.6 | \pm 0.2 |
| | 10.0 | 14.4 | \pm | 0.2 * | 10.2 | \pm 0.5 * |
| | 100.0 | 13.7 | \pm | 1.2 | 11.1 | \pm 0.6 |
| | 1000.0 | 14.4 | \pm | 0.7 | - | |
| PAP | 1.0 | 9.8 | \pm | 0.4 | 6.2 | \pm 0.6 |
| | 10.0 | 9.4 | \pm | 0.2 | 6.5 | \pm 0.5 |
| | 100.0 | 9.5 | \pm | 0.2 | 6.1 | \pm 0.6 |
| | 1000.0 | 14.3 | \pm | 0.5 | - | |
| | 0.0 | 11.7 | \pm | 0.5 | 4.9 | \pm 0.6 |

Levels of significance from control (without any drug) were determined by Student's t-test: *P<0.05

表3 Effects of paraquat, CNP (p-nitrophenyl-2,4,6-trichlorophenol) and PAP (phenthoate) on the release of β -hexosaminidase from BMCC

| | μ g/ml | β -hexosaminidase release (%) | | | |
|----------|------------|-------------------------------------|-------------|-----------|-------------|
| | | Antigen + | | Antigen - | |
| Paraquat | 0.1 | 21.2 | \pm 3.4 | - | - |
| | 1.0 | 17.9 | \pm 2.7 | 15.3 | \pm 1.0 |
| | 10.0 | 26.1 | \pm 2.2 | 17.6 | \pm 0.2 |
| | 100.0 | 20.8 | \pm 3.5 | 12.3 | \pm 1.2 |
| CNP | 1.0 | 21.3 | \pm 0.2 | 17.2 | \pm 0.5 |
| | 10.0 | 40.0 | \pm 3.0 * | 30.1 | \pm 1.5 * |
| | 100.0 | 49.2 | \pm 3.7 * | 18.7 | \pm 3.6 |
| | 1000.0 | 36.7 | \pm 4.4 | - | - |
| PAP | 1.0 | 21.7 | \pm 5.3 | 11.6 | \pm 1.7 |
| | 10.0 | 24.3 | \pm 2.3 | 15.3 | \pm 1.5 |
| | 100.0 | 22.0 | \pm 3.1 | 14.8 | \pm 1.0 |
| | 1000.0 | 43.7 | \pm 4.5 * | - | - |
| | 0.0 | 22.2 | \pm 0.7 | 12.4 | \pm 1.0 |

Levels of significance from control (without any drug) were determined by Student's t-test: *P<0.05

表4 Effect of CNP (p-nitrophenyl-2,4,6-trichlorophenol) on the release of β -hexosaminidase from human cord blood derived mast cells (CBMC)

| | $\mu\text{g/ml}$ | β -hexosaminidase release (%) | |
|-----|------------------|-------------------------------------|----------------|
| | | Anti-IgE + | Anti-IgE - |
| | 0.0 | 19.4 \pm 3.0 | 10.9 \pm 2.5 |
| CNP | 100.0 | 30.3 \pm 3.5 | - |

表 5 免疫抑制物質(DEX)、アレルゲン物質(TDI)とフェニトロン(FTN)との複合投与による影響

| 感作物質 FTN 複合投与 | Control | | DEX | | TDI | | DEX + TDI | |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | - | + | - | + | - | + | - | + |
| BW (g) | 23.1 ± 1.6 | 24.7 ± 1.4 | 22.4 ± 0.7 | 22.9 ± 0.6 | 22.9 ± 2.0 | 25.0 ± 0.8 | 22.6 ± 1.2 | 22.5 ± 1.2 |
| Spleen W. (mg) | 59.2 ± 9.1 | 71.0 ± 8.4 | 43.4 ± 2.7 | 41.7 ± 3.6 | 69.7 ± 9.7 | 73.2 ± 6.9 | 44.9 ± 4.0 | 45.6 ± 5.8 |
| Thymus W. (mg) | 30.4 ± 7.2 | 29.7 ± 4.0 | 13.5 ± 3.9 | 13.1 ± 2.4 | 26.8 ± 8.6 | 30.3 ± 2.9 | 11.6 ± 4.0 | 12.3 ± 4.3 |
| IgE (ng/mL) | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| IgM (μg/mL) | 0.72 ± 0.52 | 0.58 ± 0.66 | 1.09 ± 0.36 | 0.77 ± 0.14 | 0.94 ± 0.85 | 0.66 ± 0.25 | 2.29 ± 1.20 | 1.75 ± 2.10 |
| IFN-γ (pg/mL) | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| IL-10 (pg/mL) | 6.7 ± 3.3 | 5.3 ± 3.2 | 12.0 ± 3.3 | 15.7 ± 1.0 | 9.1 ± 6.0 | 12.3 ± 3.5 | 14.8 ± 4.7 | 14.4 ± 6.1 |

N.D.: 検出限界以下
 検出限界 IgE: 10ng/mL, IgM: 0.3 μg/mL, IFN-γ: 3.9pg/mL, IL-10: 1.2pg/mL

図1 免疫抑制物質(DEX)、アレルゲン物質(TDI)とフェニトロチオン(FTN)の複合投与による脾臓および胸腺重量の変化

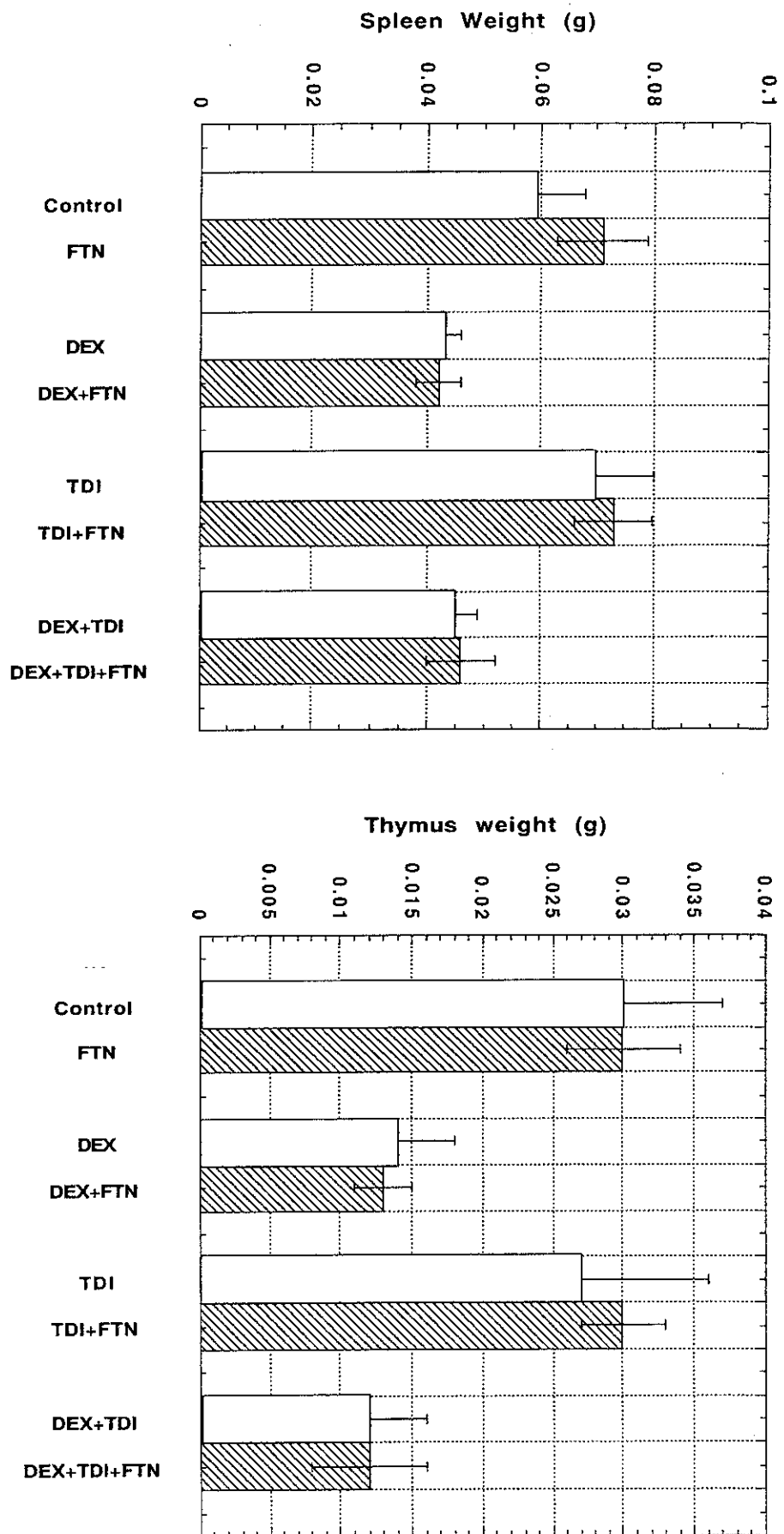
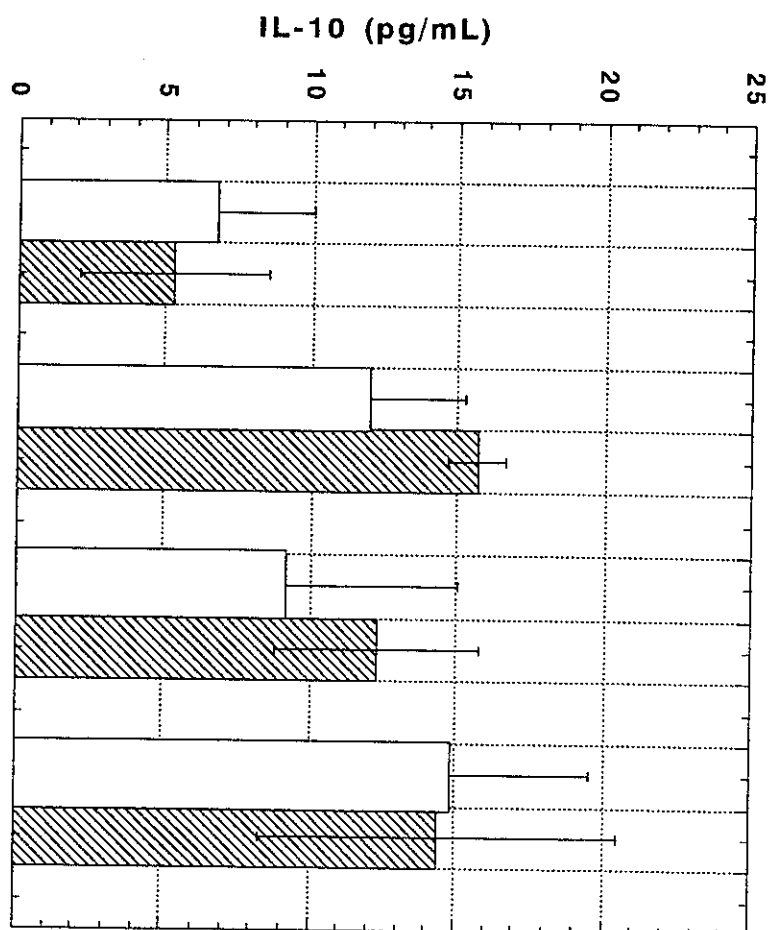
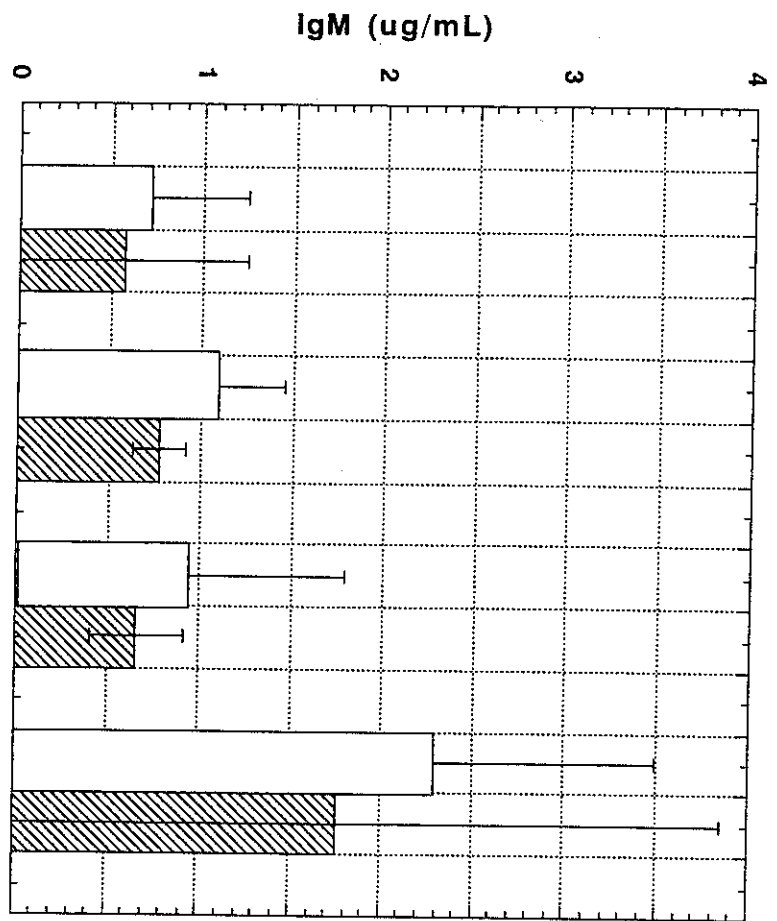


図2 免疫抑制物質(DEX)、アレルゲン物質(TDI)とフェニトロチン(FTN)の複合投与による総IgM濃度およびIL-10濃度の変化



分担研究報告書

食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究

分担研究者

大野泰雄（国立衛研、安全生物研、薬理部）

協力研究者

山添 康（東北大学薬学部）

杉山雄一（東京大学薬学部）

研究要旨

ゴム添加物として使用されている Mercaptobenzimidazole (MBI)の反復投与は肝 Microsome の薬物代謝活性を低下させた。一方、MBI の 4-あるいは 5-位のメチル化体(それぞれ 4-MMBI, 5-MMBI)ではこのような抑制は認められず、逆に代謝活性を誘導した。これらに対応して MBI では CYP2C11 と CYP3A および CYP4A1 が大きく低下し、4-MMBI と 5-MMBI では CYP1A1/2 あるいは CYP2B1/2 が大きく増加した。一方、*in vitro* でこれらはいずれも Testosterone の主代謝経路である CYP3A の関与する 6 β 水酸化活性を強く阻害した。これらのことから上の三化合物は他の薬物の代謝を阻害あるいは代謝活性の促進によりする薬物相互作用を起こす可能性が示された。

また、食品あるいは生薬中に含まれる成分による薬物代謝酵素阻害活性を検討したところ、多くのフラノクマリン類が CYP3A の関与する Testosterone の 6 β 水酸化活性を低濃度で強く抑制することを示した。

更に、薬物代謝の競合あるいは非競合阻害に基づく *in vivo* 薬物間相互作用を、生理学的薬物速度論の手法を用いて *in vitro* 試験データから定量的に予測する方法の検証を目的とし、文献情報に基づく解析を行った。その結果、*in vivo* 薬物間相互作用は、肝臓入口における阻害剤濃度を用いることによりある程度定量的な予測が可能であり、循環血中濃度のみを用いた場合には大きく過小評価される可能性があることが示唆された。

キーワード：MBI、フラノクマリン、ヒト組織、P450、薬物相互作用

A. 研究目的

農薬等の相乗毒性については以前より懸念されてきたが、それらの間の組み合わせは膨大であり、一つ一つ検討することは不可能であった。しかし、医薬品での経験から相互作用についてはその多くが薬物動態学的な相互作用に起因することが明らかになってきた。また、最近の

バイオテクノロジーの進歩により、多くの Cytochrome P-450 (P-450)分子種を手に入れることが出来るようになり、医薬品の代謝に関する P-450 分子種レベルでの検討が可能となるとともに、生活関連物質のなかにもグレープフルーツジュース成分のように医薬品の代謝を強く阻害する物があることが示されてきた。しかし、

農薬や生活関連物質の相互作用予測に必要な薬物動態に係る薬物代謝酵素についての分子種レベルでの検討やヒト肝組織を用いた検討はほとんど行われておらず、この面からの相乗毒性の予測に関する研究も見当たらない。そこで本研究においては、生活関連物質による複合的影響の可能性を評価するための基礎的研究の一環として、代表的有機農薬や生活関連物質の代謝を動物及びヒト組織、細胞、また発現系ヒト型 P-450 等を用いて検討するとともに、*in vitro* の結果から *in vivo* での相互作用をシミュレーションする方法を検討することを目的とした。

昨年度は有機リン系農薬である IBP について検討し、それが主に CYP3A で代謝されることを示し、Ketoconazole やグレープフルーツジュースとの相互作用により毒性が強まる可能性を示した。今年度はゴム保存剤として広く使用されている Mercaptobenzimidazole (MBI) およびその類縁化合物 2-Mercapto-4-methylbenzimidazole (4-MMBI), 2-Mercapto-5-methylbenzimidazole (5-MMBI) 肝薬物代謝活性に対する影響を検討した。また、キョウカツやハクジュツ (共にセリ科) を中心とする薬用植物に含まれるフラノクマリン誘導体のヒトチトクローム P450、とくに CYP3A4 に対する阻害作用を検討した。また、昨年度は Sorivudine で代表されるような mechanism-based inhibition が関与する薬物相互作用を *in vitro* 試験データから、生理学的速度論モデルに基づいて、ヒトにおける *in vivo* での相互作用を定量的に予測することを試み、Sorivudine の服用により血中 5-FU 濃度は単独投与時の5倍以上に上昇することが予測された、という結果を報告した。しかし、実際に臨床で相互作用が生じた患者の血中濃度は測定されていないため、本予測方法の妥当性について考察することは不可能であった。そこで本年度は、薬物の血中濃度、肝臓

中濃度、および肝臓中の酵素活性を直接測定することが可能な動物実験を行うことにより、Mechanism-based inhibition に基づく薬物間相互作用の *in vitro* から *in vivo* への予測法の妥当性について検討した。

B. 研究方法

B-1) *in vivo* 薬物代謝活性への影響の検討

日本 SLC より購入したラット(Wistar系、雄、5週令)に MBI (0.3mmol/kg), 4-MMBI, 5-MMBI (それぞれ 0.6mmol/kg), 4-MMBI と 5-MMBI の混合物(MMBI として 0.6, 1.2mmol 相当/kg)をコーン油(5mL/kg)に溶かして8日間反復経口投与した。その後定法に従い Microsome 分画を調製し、7-Ethoxycoumarine, 7-Ethylresorufin, 7-Pentylresorufin の脱アルキル化活性(ECOD, EROD, PROD)、Cytochrome P450 (P450)含量 および NADPH-cytochrome P450 reductase (P450 red.)を測定した。また、Western blot 法により阻害あるいは誘導される CYP 分子種について検討した。

B-2) *in vitro* 代謝活性の測定

Testosterone の代謝活性の測定は未処理の雄性 Wistar 系ラットの肝 microsome を用いて MBI の共存および非共存下で 0.2mM Testosterone, 2mM NADPH 全体を 1 ml となるようにして 37°C 15 分インキュベートした。生成した代謝物は酢酸エチルで抽出後、HPLC で測定した。

B-3) 生理学的モデルに基づく *in vivo* 相互作用の予測

臨床における薬物の濃度は多くの場合、それ自身の代謝に関するミカエリス定数 (K_m) と比較して十分低く、代謝阻害剤併用時と非併用時の血中濃度時間曲線下面積 (AUC) の比 ($R = AUC (+ \text{inhibitor}) / AUC (\text{control})$) を相互作用の指標とした場合、競合阻害と非競合阻害による相互作用の程度は $R = 1 + I_u/K_i$ とあらわされる。ここで、 I_u は酵素近傍における阻害剤の非結合型濃度、 K_i は肝 Microsome 等

を用いた *in vitro* 代謝試験で得られる阻害定数を示す。ヒトにおいて I_u の正確な値を見積もることは困難であるので、我々は、False negative な予測、すなわち相互作用の過小評価を避けるため、肝動脈血と門脈血が合流して肝臓へ流入する部分の血中最大非結合型濃度 ($I_{in,u}$) を I_u の最大値と考え、生理学的モデルにしたがって以下の式により阻害剤経口投与時の $I_{in,u}$ を推定する方法を提唱してきた。

$$I_{in,u} = \left(I_{max} + \frac{ka \cdot D \cdot Fa}{Qh} \right) \times fu \quad (1)$$

ここで、 I_{max} は阻害剤の循環血中最大濃度、 ka は消化管からの吸収速度定数、 D は投与量、 Fa は吸収率、 Qh は肝血流量、 fu は血中非結合型分率をあらわす。

本研究では、各種 CYP isozyme の阻害剤あるいは基質となることが知られている多くの薬物（以下、阻害剤と略す）について、文献情報を用いて I_u/K_i 値を算出し、*in vivo* の相互作用の報告値と比較した。 K_i 値はヒト肝 Microsome あるいはヒト CYP 発現系を用いた *in vitro* 試験により算出されているものを文献検索により調査し、 K_i 値の報告がない薬物については代わりに K_m 値を用いた。式 (1) の I_{max} としては、各阻害剤のヒトにおける血中濃度推移の報告値から、線形体内動態を仮定して、常用量投与時の循環血中最大濃度を推定した。 ka 、 Fa 、 Qh はそれぞれ 0.1 min^{-1} 、1, 1610 mL/min と仮定し、 D には各阻害剤の常用量、 fu には文献情報より得た値を代入することにより、式 (1) を用いて各阻害剤の $I_{in,u}$ を算出した。一方、各阻害剤が関与するヒト *in vivo* での相互作用について、該当する CYP isozyme の基質となる薬物の AUC 上昇率（単独投与時の AUC に対する割合）を文献調査により得た。

C. 研究結果

C-1 MBI, 4-MMBI, 5-MMBI のラット肝 Microsome での薬物代謝に及ぼす *in vivo* 反復投与の影響 (図 1)

いずれの薬物投与群においても対照群に比べて、甲状腺および肝臓の相対臓器重量は優位に増加していた。肝臓より調製した Microsome 画分の薬物代謝酵素活性について測定した結果、ECOD は MBI (0.3mmole/kg)投与群では約 1/2 に減少し、4-MMBI (0.6), 5-MMBI (0.6), MMBI mix (0.6, 1.2)投与群では 1.3-2.0 倍に増加した。EROD は 5-MMBI 投与群では 4.2 倍、4-MMBI, MMBI mix 投与群では 10-13 倍に増加した。PROD は各投与群で上昇し、特に 5-MMBI (0.6), MMBI mix (1.2)投与群では各々 4.9 倍に上昇した。一方、MBI 投与群では P450 含量が有意に減少し、P450 red は対照群の約 1/2 まで低下しており、甲状腺毒性の発現の差には、薬物代謝系の誘導と阻害の差が関係していると考えられた。更に Western blot 法を用いた解析の結果、4-MMBI 投与群では CYP1A1/2 が、5-MMBI (0.6)投与群では CYP2B1/2 が著しく誘導されており、4-MMBI と 5-MMBI では誘導される CYP 分子種が異なることが示された。

C-2 ラット Microsome での Testosterone 代謝に及ぼす MBI, 4-MMBI, 5-MMBI の *in vitro* 処置の影響 (図 2)

ラット肝 Microsome 分画における Testosterone の NADPH 依存性代謝により代謝物として 6β -OH, 16α -OH, 2α -OH 体が検出された。これら以外に微量ではあるが、 6α -OH, $15b$ -OH, $15a$ -OH, $7a$ -OH, $16b$ -OH, $2b$ -OH 体が検出された。 $30\mu\text{M}$ の MBI, 4-MMBI, 5-MMBI はこれらのうち 6β -OH, $15b$ -OH, $15a$ -OH, $16b$ -OH, $2b$ -OH 体の生成を抑制した。一方、MBI の代謝産物である Benzimidazole では特に有意な抑制は認められなかった。最も高い活性の認められた 6β -OH 体への代謝の抑制

は MBI と 5-MMBI とが同程度で 4-MMBI による抑制はそれらより弱かった。また、これらの抑制は MBI 等による 5 分間の前処理により強まった。また、MBI による 6 β -OH 体への代謝の抑制は 10 μ M でも 50%以上の抑制が認められた。

C-3 植物成分の薬物代謝酵素阻害作用 (図 3、4、表 1)

今回キョウカツやハクジュツから単離された短鎖フラノクマリン(C1 側鎖) 3 種、中鎖フラノクマリン単量体 (C5 側鎖) 1 6 種、中鎖フラノクマリン 2 量体 7 種、さらに対照としてグレープフルーツジュースに含まれる 9 種のフラノクマリングラニル誘導体の作用を調べた。今回検討した物質の構造は単量体を図 3 に、2 量体および 3 量体の構造を図 4 に示した。

ヒト Microsome による Testosterone 6 β -水酸化活性を指標に用いた。終濃度 100 マイクロモル/L の条件では短鎖フラノクマリンを除くほとんどの比験物質が Testosterone 水酸化をコントロールの 40% 以下にまで低下させた。これら物質の 50%阻害濃度(IC50 値)を表 1 に示した。これら中鎖フラノクマリン単量体 (C5 側鎖) および中鎖フラノクマリン 2 量体の阻害活性はメチラボンよりも強く、ケトコナゾールとほぼ同等の値を示した。これらの値はグレープフルーツジュース成分とほぼ同等と考えられる。中鎖フラノクマリン 2 量体が単量体よりも強い阻害を示した原因を知るため、予め NADPH の存在下で Microsome と中鎖フラノクマリンを反応させ、後で Testosterone を添加したときと、同時添加時の阻害を比較してみたところ、中鎖フラノクマリン類は前処理によってより強い阻害を示した。このことから競合阻害だけでなく、酵素不活化による阻害がおこっているため強い阻害を示すものと推定された。

C-4 薬物相互作用の理論的予測

本研究で $I_{in,u}/K_i$ 値の算出が可能であった阻害剤と CYP isozyme の組み合わせ 115 種類について、阻害される CYP isozyme ごとに分類すると、CYP3A4 に関する相互作用が 42 種類と最も多く、次いで CYP2D6 (35 種類)、CYP1A2 (13 種類)、CYP2C9 (12 種類) の順であった。

表 2 に示すように、調査した阻害剤の約半数において、算出された $I_{in,u}/K_i$ 値は 0.2 より小さく、そのうち約 8 割の阻害剤について、*in vivo* での相互作用は報告されていないか、あるいは「相互作用なし」と報告されていた。一方、算出された $I_{in,u}/K_i$ 値が 2 より大きい阻害剤は全体の 16%であり、そのうち約 8 割の阻害剤について、2 倍以上の AUC 上昇を伴う *in vivo* 相互作用が報告されていた。また、5 倍以上の AUC 上昇を伴う *in vivo* 相互作用が報告されている阻害剤について算出された $I_{in,u}/K_i$ 値は、すべて 2 より大きかった。

一方、 I_u として $I_{in,u}$ ではなく、循環血中最大非結合型濃度 ($I_{max,u} = I_{max} \times fu$) を用いた場合について、同様の解析をした結果を表 3 に示す。 $I_{max,u}/K_i$ 値は、約 9 割の阻害剤で 0.2 より小さく、そのうち約 3 割では 1.2 倍以上の AUC 上昇を伴う *in vivo* 相互作用が報告されていた。また、5 倍以上の AUC 上昇を伴う *in vivo* 相互作用が報告されている阻害剤のうち、算出された $I_{max,u}/K_i$ 値が 0.2 より小さいものが半数を占めた。

D. 考察

構造の類似した MBI, 4-MMBI, 5-MMBI のラット肝薬物代謝酵素への影響は全く異なっており、MBI では CYP2C11, 3A2, 4A1 の含量の低下とエトキシクマリン代謝活性の低下が現れたが、4-MMBI では 1A1/2 また 5-MMBI では 2B1/2 の誘導とそれらの関与する代謝酵素活性の著しい増

加が認められた。一方、*in vitro* では多少の強さの差はあるものの、いずれも Testosterone の 6β -OH 体への代謝を抑制し、類似していた。これは *in vitro* での結果を直接 *in vivo* に外挿する事の危険性を示している。一方、前処理により酵素阻害活性が更に低下したことから、代謝により非可逆的に酵素阻害を起こす、いわゆる Mechanism based inhibition 的な作用を有する可能性が示された。また、MBI は $10\mu\text{M}$ という低濃度で Testosterone 代謝を抑制した。このような結果は MBI の暴露によりホルモンや農薬、医薬品、生活関連物質等の代謝が阻害され、内分泌系の異常や農薬や医薬品毒性が強くと現れる可能性を示唆している。MBI とは逆に、4-MMBI, 5-MMBI ではそれぞれ CYP1A1/2 や CYP2B1/2 の誘導を起こしたことから、それらにより代謝を受ける医薬品の有効性を低下させる可能性を示唆している。

グレープフルーツジュース相互作用はカルシウムチャネル阻害薬の作用を増強し、過度の血圧低下を招くことが報告されて以来、臨床上重要な多くの薬の薬効・動態を変動させることがわかってきている。一方、申請者らは物質と生体影響の両面からグレープフルーツジュース相互作用を調べ、従来考えられてきたフラボノイドではなく、フラノクマリンが主起因物質であり、新規物質のフラノクマリン 2 量体、GF-I-1 と GF-I-4 が CYP3A4 と呼ばれるチトクロム P450 を強力に阻害することを明らかにしてきた。今回の結果は、キョウカツやハクジュツ（共にセリ科）を中心とする薬用植物に含まれるフラノクマリン誘導體もグレープフルーツと同様に強い CYP3A による Testosterone や医薬品の代謝を抑制する可能性を示した。また、予め NADPH の存在下で Microsome と中鎖フラノクマリンを反応させ、後で Testosterone を添加した

結果からそれらの阻害様式は必ずしも競合阻害だけでなく、酵素不活化による不可逆的な阻害もおこっていることを推定させた。このような場合、阻害が蓄積し、大きな薬物相互作用を起こす可能性がある。即ち、フラノクマリンを含む生薬の 1 日使用量を 1.5g とし、これらが完全に溶解すると、500 ml の煎じた状態で飲まれた場合、FM-7 および FM23 の濃度は 19 および $7.6\mu\text{M/L}$ となる。この濃度は 50% 阻害濃度 (IC₅₀ 値) よりも高く、実際の阻害が起こる可能性を示している。今後 *in vivo* における阻害を検討したいと考えている。

我々は、薬物代謝の競合あるいは非競合阻害に基づく *in vivo* 薬物間相互作用を、阻害剤の I_u/K_i 値に基づいて予測する方法論を提唱し、tolbutamide/sulfaphenazole (CYP2C9 における相互作用)、triazolam/ketoconazole (CYP3A4 における相互作用) 等の組み合わせについて、定量的予測が可能であったことを報告してきた。本研究では、この方法論をさらに多くの阻害剤に適用し、妥当性の評価を行うことを目的とした。

Table 1 に示したように、 I_u として阻害剤経口投与後の肝臓入口における非結合型濃度の最大値を用いた場合には、算出された I_u/K_i 値と *in vivo* での相互作用の報告値とはある程度対応していたが、それでも I_u/K_i 値が 0.1 以下にもかかわらず *in vivo* で 2 倍以上の AUC 上昇が報告されているものもあり、false negative な予測を完全に避けることはできなかった。この原因としては、*in vivo* での相互作用に、今回 I_u/K_i 値を算出した CYP isozyme 以外の酵素あるいは薬物輸送担体が関与している可能性、代謝阻害に mechanism-based inhibition が関与する可能性、あるいは阻害剤が肝臓へ能動輸送されるため、肝臓中濃度が血中濃度より高く、式 (1) により算出される $I_{in,u}$ を用いてもまだ I_u が過

小評価されている可能性などが考えられる。

一方、阻害剤の消化管からの吸収に由来する吸収項(式(1)の第2項)を考慮せず、 I_u として循環血中濃度のみを用いた場合には、Table 2に示すように、false negativeな予測の可能性が大きく増大した。多くの薬物について、経口投与した場合の肝臓入口における濃度は、消化管からの吸収に由来するものの寄与が大きいことから、false negativeな予測を避けるために、これを無視することはできないことが明らかとなった。

以上より、薬物代謝阻害に起因する *in vivo* 薬物間相互作用は、阻害剤の $I_{in,u}/K_i$ 値に基づいてある程度定量的に予測することが可能であり、循環血中濃度のみを用いた場合には大きく過小評価される可能性があることが示唆された。

E. 結論：

ゴムの保存剤として使用されている MBI により薬物代謝酵素活性が強く抑制され、他の薬物等の毒性を増強する可能性が示唆された。ただ、*in vitro* で類似した作用を示した MBI のメチル化体ではこのような作用を示さず、逆に酵素誘導を起こし、医薬品の代謝を促進し作用を弱める可能性が示唆された。また、グレープフルーツ以外にも薬物代謝活性を低濃度で強く阻害するフラノクマリン誘導体が植物中に多く存在することを示した。薬物代謝阻害に起因する *in vivo* 薬物間相互作用は、阻害剤の $I_{in,u}/K_i$ 値に基づいてある程度定量的に予測することが可能であり、循環血中濃度のみを用いた場合には大きく過小評価される可能性があることが示唆された。

F. 研究発表：

1. 論文発表

1) Sakemi K., Usami M., Mitsunaga K., Ohno

Y., Tsuda M., Comparative toxicokinetic study of rubber antioxidants. 2-Mercaptobenzimidazole and 2-mercaptomethylbenzimidazole, by single oral administration in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 24, 399-405, 1999.

2) Saitoh M., Umemura T., -- Ohno Y., -- Tsuda M., Toxicity study of a rubber antioxidant, mixture of 2-mercaptomethylbenzimidazoles, by repeated oral administration to rats. *Food and Chemical Toxicol.*, 37, 777-787, 1999.

3) 山添康：“薬物相互作用”岩波講座「現代医学の基礎」第13巻「薬物動態と薬効」岩波書店 1999

4) L.-Q. Guo, M. Taniguchi, Y.-Q. Xiao, K. Baba, T. Ohta and Y. Yamazoe. 2000 Inhibitory effect of natural furanocoumarins on human microsomal cytochrome P450 3A activity. *Jpn. J. Pharmacol.*, 82: 122-129.

5) W. Tassaneeyakul, W. Tassaneeyakul, S. Vannaprasart and Y. Yamazoe. 2000 Omeprazole sulfone, but not 5-hydroxyomeprazole, is inhibited by ingestion of grapefruit juice. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 49: 139-144.

6) T. Nakamura, K. Okada, K. Nagata and Y. Yamazoe. 2000 Intestinal cytochrome P450 and response to rifampicin in rabbits. *Jpn. J. Pharmacol.*, 82: in press.

7) Kanamitsu, S., Ito, K., Okuda, H., Ogura, K., Watabe, T., Muro, K., Sugiyama, Y. : Prediction of *in vivo* Drug-Drug Interaction based on Mechanism-based Inhibition from *in vitro* Data: Inhibition of 5-Fluorouracil metabolism by (E)-5-(2-Bromovinyl)uracil. *Drug Metab. Dispos.* (in press)

8) Kanamitsu, S., Ito, K., Green, C. E., Tyson, C. A., Shimada, N., Sugiyama, Y. : Prediction of *in vivo* interaction between triazolam and erythromycin based on *in vitro* studies using human liver microsomes and

recombinant human CYP3A4. Pharm. Res. (in press)

9) Kanamitsu, S., Ito, K., Sugiyama, Y. : Quantitative prediction of in vivo drug-drug interactions from in vitro data based on physiological pharmacokinetics: Use of maximum unbound concentration of inhibitor at the inlet to the liver. Pharm. Res. (in press)

10) Komatsu, K., Ito, K., Nakajima, Y., Kanamitsu, S., Imaoka, S., Funae, Y., Green, C. E., Tyson, C. A., Shimada, N., Sugiyama, Y. : Prediction of in vivo drug-drug interactions between tolbutamide and various sulfonamides in humans based on in vitro experiments. Drug Metab. Dispos. (in press)

2. 学会発表

宮島敦子、簾内桃子、引間知広、酒見和枝、津田充宥、大野泰雄、2-mercapto-benzimidazole (MBI)およびそのメチル誘導学会発表体のラット肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響について、第26回日本トキシコロジー学会(1999,7)

G. 知的所有権の取得状況

なし

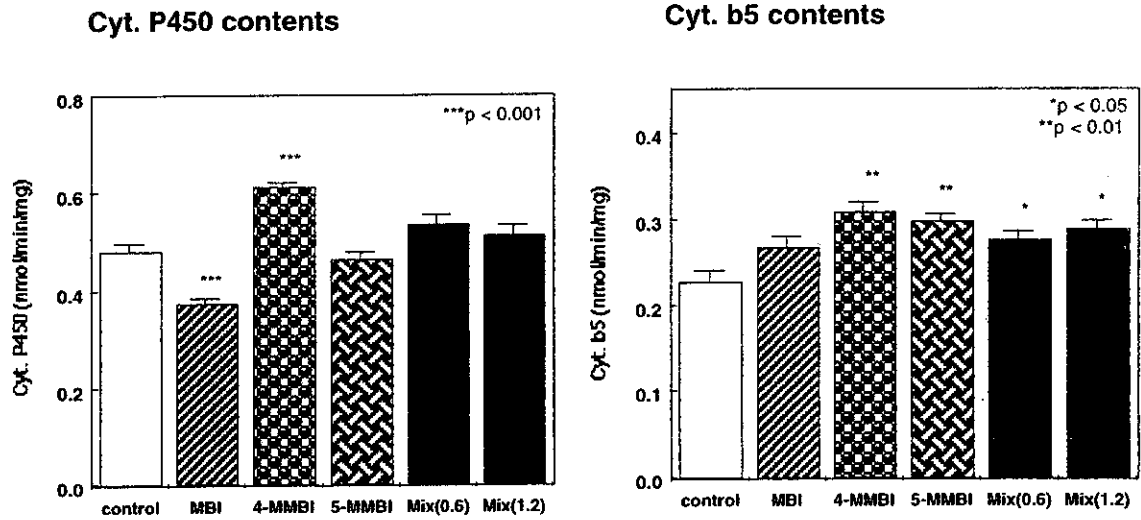
表 1. Effect of furanocoumarin derivatives (F) on human liver microsomal testosterone 6 β -hydroxylation (IC50, μ M)

| Class | F | IC50 | F | IC50 | F | IC50 | F | IC50 | |
|------------|--------------|------|-------|----------------|-------|-------|-------|------|--|
| Monomers | FM-1 | 5.1 | FM-2 | 3.1 | FM-3 | 2.9 | FM-4 | 1.9 | |
| | FM-5 | >100 | FM-7 | 2.9 | FM-13 | 1.1 | FM-17 | 1.0 | |
| | FM-6 | 25 | FM-8 | 1.8 | | | FM-18 | 3.2 | |
| | | | FM-9 | 3.8 | FM-14 | 30 | FM-19 | 5.8 | |
| | | | FM-10 | 1.5 | FM-15 | 4.8 | FM-20 | 2.6 | |
| | | | FM-11 | 18 | FM-16 | 35 | FM-21 | 19 | |
| | | | FM-12 | 8.4 | | | FM-22 | 4.3 | |
| | | | FM-23 | 0.44 | | | | | |
| | | | FM-24 | 0.42 | | | | | |
| | | | FM-25 | 22 | FM-29 | 0.59 | | | |
| | | | FM-26 | 0.67 | | | | | |
| | | | FM-27 | 2.0 | | | | | |
| | | | FM-28 | 1.8 | | | | | |
| | Dimers | | | FD-L1 | 0.086 | FD-L4 | 0.16 | | |
| | | | | FD-L2 | 0.15 | | | | |
| | | | FD-L3 | 0.052 | | | | | |
| | | | FD-R1 | 0.62 | FD-R2 | 0.23 | FD-R6 | 0.21 | |
| | | | | | FD-R3 | 0.32 | FD-R7 | 0.42 | |
| | | | | | FD-R4 | <1 | | | |
| | | | | | FD-R5 | <1 | | | |
| Trimer | | | | FT-1 | 0.19 | | | | |
| Typical | ketoconazole | | 0.11 | troleandomycin | | >100 | | | |
| inhibitors | metyrapone | | 9.2 | erythromycin | | >100 | | | |

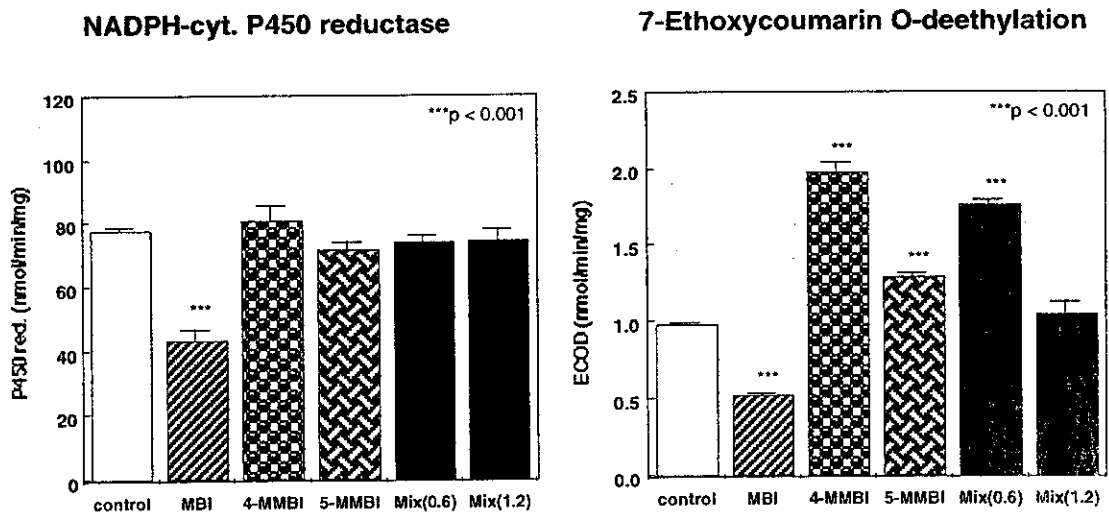
Relationship between ln_u/Ki ratio and the degree of *in vivo* interaction

| ln_u/Ki | <i>in vivo</i> AUC % | | | | | Total | | |
|--------------|----------------------|----------|----------|----------|-----------|----------|------------|------------|
| | 100 | <120 | <150 | <200 | <500 | | ≥ 500 | No data |
| <0.1 | 5 | | 3 | 2 | 2 | 30 | 42 | |
| <0.2 | 1 | | 1 | 2 | 1 | 11 | 16 | |
| <0.5 | 2 | | | 1 | 3 | 2 | 8 | |
| <1.0 | 1 | | 2 | 4 | 2 | 6 | 15 | |
| <2.0 | | 1 | | | 3 | 7 | 11 | |
| <3.0 | | | | | 1 | 1 | 2 | |
| <5.0 | | | 1 | | 2 | 2 | 6 | |
| <10.0 | | | | | | | 0 | |
| ≥ 10.0 | | | | | 4 | 3 | 2 | 9 |
| Total | 9 | 1 | 7 | 9 | 18 | 6 | 59 | 109 |

1-1: The effects of MBI and MMBI on cytochrome P450 and b5 contents

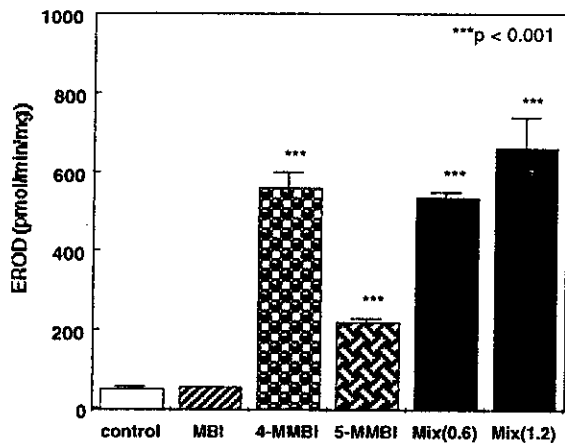


1-2: The effects of MBI and MMBI on rat liver microsomal activities

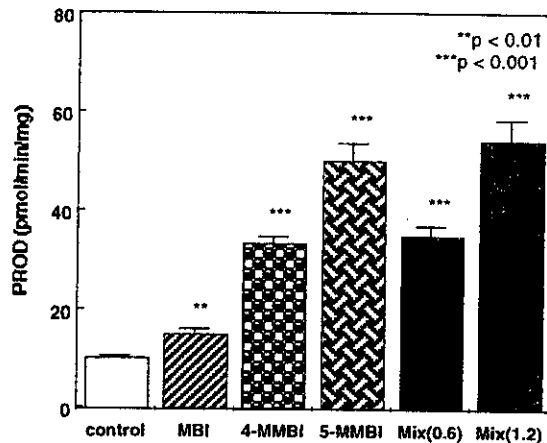


1-3: The effects of MBI and MMBI on rat liver microsomal activities

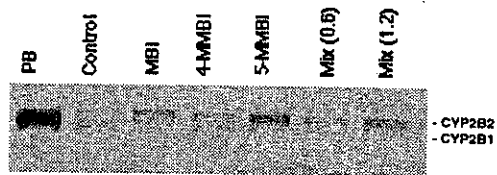
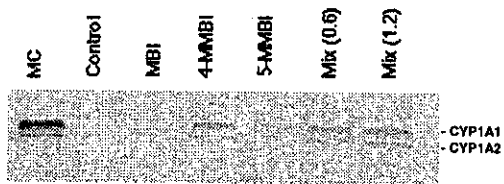
7-Ethoxyresorufin O-deethylation



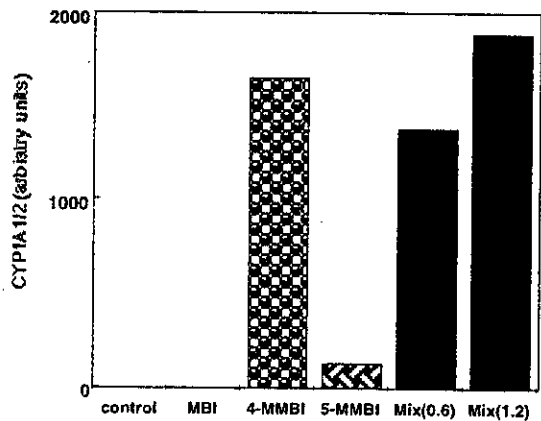
7-Pentylresorufin O-depentylation



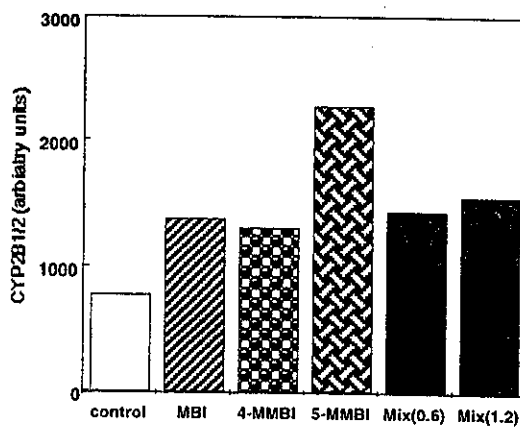
1-4: Western blot analyses of CYP1A1/2 and 2B1/2



CYP1A1/2

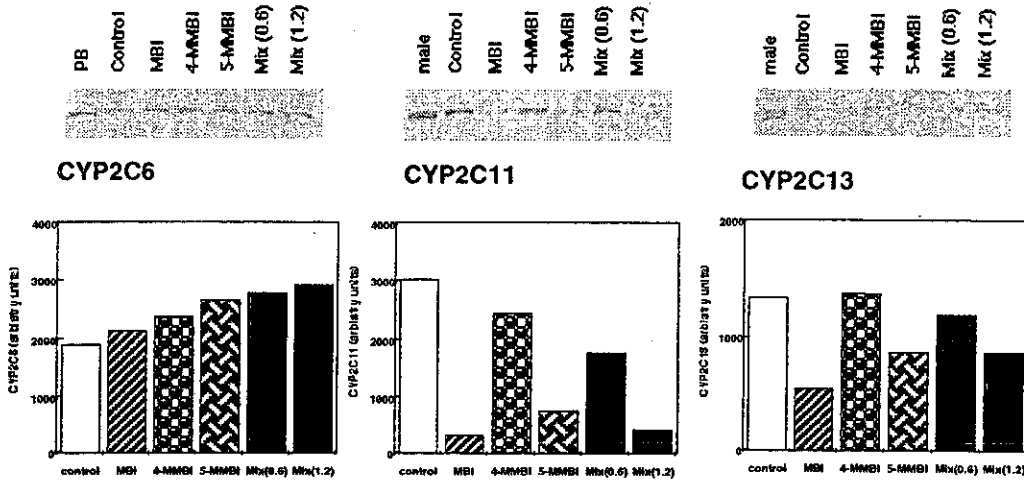


CYP2B1/2



1-5:

Western blot analyses of CYP2C6, 11 and 13



1-6:

Western blot analyses of CYP2E1, 3A2 and 4A1

