

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物 評価に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター・薬理部
研究者 大野 泰雄

分担研究者

山添 康	東北大学薬学部	衛生化学教室
杉山雄一	東京大学薬学部	製剤学教室
池田敏彦	三共(株)	分析代謝研究所
馬場隆彦	塩野義製薬(株)	新薬研究所
丹波俊朗	藤沢薬品工業(株)	薬物動態研究所
大石哲久	中外製薬(株)	薬物動態研究所
藤井敏彦	大日本製薬(株)	開発研究所

要旨：薬物に関与する酵素とその遺伝的多型について解析した。また、ヒト肝における酵素誘導および小腸の薬物相互作用予測が可能な動物モデルを構築し、さらにトランスポーターレベルでの薬物相互作用の定量的な予測系を確立した。

1. 研究目的

医薬品に関する臨床上の大きな問題として、薬物代謝酵素の遺伝多型と薬物間相互作用があげられる。薬物代謝酵素の遺伝多型性は人種および個人による薬効の差となって発現し、また、薬物相互作用は併用薬ならびに食品中成分による薬物代謝酵素の誘導あるいは阻害によって引き起こされている。医薬品の使用に際して、いわゆるハイリスクな状態にある患者は、副作用が強く現れたり、逆に十分な作用が現れず、治療に重大な支障を来す可能性がある。一方、医薬品の臨床試験は、通常、健常者や一般的な患者において行われ、薬物の代謝に関与する酵素に稀にしか存在しない遺伝的多型を有する患者において試験が行われることは希有である。従って、臨床試験からこのような患者についての結果は得られないことが多く、医薬品の開発および評価に際しては、*in vitro* や動物実験の結果から、ハイリスク患者での医薬品の体内動態を予測することが必要である。薬物間相互作用の生じる可能性をあらかじめ *in vitro* 試験から予測する方法論を確立することは、医薬品の安全性の確保とともに、医薬品開発の効率性からも重要となっている。そのため、対象となっている薬物の肝・小腸における代謝に関与する個々の P450 酵素と多型についての解析、ヒトの薬物酵素誘導および薬物相互作用予測のための動物モデルの構築、さらにトランスポーターを介した薬物相互作用予測系の確立を試みた。

本研究では、基礎的な研究をも含み *in vitro* での代謝試験結果から *in vivo* 予測のための検討を重ねた。そこで、1) 薬物代謝酵素に関する基礎的研究としてプロドラッグの代謝活性化に関与する代謝酵素等の因子と個体差を、ヒト肝ミクロソームおよび発現系を用いて解析し、また、ウサギ小腸に存在する P450 酵素の種類と活性、および抗ヒスタミン薬 Ebastine の水酸化活性を有するサル小腸ミクロソームにおける P450MI-2 について検討した。さらに、薬物添加による recombinant CYP3A4 活性の上昇についても検討を加えた。また、2) 個々の薬物の代謝に関与する酵素の特定とその変動要因および *in vitro* での代謝試験結果からの *in vivo* 予測のため、肝および小腸における個々の P450 酵素、Maxacalcitol の代謝に関与するヒト CYP24、マーモセットにおける酵素誘導、Grape fruit juice (GFJ) がウサギにおける Nifedipine 代謝に及ぼす影響等について検討した。また、薬物相互作用の予測性向上のための検討も行った。さらに、3) トランスポーターを介した輸送過

程における薬物間相互作用においては、排泄における相互作用の解析時、血液から細胞内への取り込み、細胞から胆汁あるいは尿中への排泄における相互作用の程度を分離して評価する必要がある。しかし現在までのところ、これら素過程を分離して評価し相互作用を予測した例は皆無である。本研究においては、*in vitro* 試験からトランスポーターを介した相互作用を予測できるか否かを明らかにすることを試みることにより、薬物の安全性について検証することを目指した。

2. 研究方法

- 1) GENTEST 社 (Woborn, MA) 製の 12 人の白人由来ヒト肝ミクロソームおよび上清画分を酵素源とし、FT (Tegafur; 5 mM) または 5'-DFUR (Doxifluridine; 5 mM) より 5-FU (5-Fluorouracil) への酵素反応に依存する変換活性を測定した。上清画分を用いる反応系には、5-FU の分解酵素であるジヒドロピリミジン脱水素酵素の阻害剤を共存させた。生成した 5-FU は高速液体クロマトグラフィーにより分離定量した。また、10 週齢及び 11 週齢の Newzealand White 系雄性ウサギから腸管上皮粘膜のミクロソームを調製した。P450 を発現する腸管上皮の形状は部位によって異なるため、本研究では小腸を 3 つに分割し、幽門から約 25 cm を十二指腸とし、残る腸管を半分に分割し、前半を空腸、後半を回腸とした。それぞれの薬物代謝活性として CYP3A4 (Testosterone 6 β -hydroxylation) 活性、CYP2D (Dextromethorphan O-demethylation) 活性、CYP2C9 (Phenytoin 4'-hydroxylation) 活性、CYP1A (2-Amino-1methyl-6-phenylimidazo-[4,5-l]pyridine; PhIP 代謝活性化) 活性を測定した。さらに Western blot 分析により P450 分子種の含量を測定した。抗ヒト CYP4F 抗体の作製は以下のように行った。まず、ヒト肝 cDNA ライブラリーより CYP4F2 遺伝子をクローニングし、それを酵母内に発現させ、得られたミクロソーム画分からヒト組換え CYP4F2 を精製した。これをウサギに免疫し、CYP4F に対するポリクローナル抗体を作製した。Benzyloxyresorufin O-dealkylation (BROD) 活性は、7-Benzyloxyresorufin をヒト肝ミクロソーム又は種々の baculovirus 発現系ヒト CYP (Gentest 社) と NADPH 生成系存在下にて反応させ、acetonitrile で除蛋白後、生成した resorufin を HPLC (蛍光検出器を装着) にて分析した。
- 2) Maxacalcitol 代謝は、ラットおよびヒト CYP24 を発現した大腸菌膜画分を用いた再構成系を用いて検討した。³H]maxacalcitol およびその代謝物はメタノールにて抽出後 HPLC にて分析した。雄性マーモセット (n=3) に種々の P450 誘導剤を投与し、肝の薬物代謝酵素活性を測定した。また雄性マーモセット (n=2) から調製した初代培養肝細胞に P450 誘導剤を 96 時間処置し CYP3A4 (Nifedipine oxidation および Testosterone 6 β -hydroxylation) 活性を測定した。初代培養ヒト肝細胞の Rifampicin (RIF) および Troglitazone による CYP3A4 (Testosterone 6 β -hydroxylation) 活性を測定した。続いて初代培養マーモセット肝細胞を用いた薬物代謝酵素誘導を検討した。さらにマーモセットで得られた結果がヒトの予測に応用できるか否かを確認する目的で、初代培養ヒト肝細胞による薬物代謝酵素誘導を実施した。さらに、Newzealand White 系雄性ウサギ (10 週齢) への前処置として、Grape fruit juice (GFJ) を 1 日 2 回各 10 ml/kg の用量で 5 日間経口投与した。尚、ウサギは Nifedipine 投与の 48 時間前から絶食させた。Nifedipine は 15% ポリエチレングリコール 300 に溶解し 5 mg/kg の用量で経口投与した。投与後、経時的に 1 ml ずつ採血し、得られた血清中の Nifedipine 濃度は HPLC により測定した。次ぎに、ヒト肝ミクロソームを用いて、主要なチトクローム P450 (CYP) 分子種である CYP2C9 及び CYP3A4 の代謝活性につき、各々 Tolbutamide 及び Diclofenac (CYP2C9) 並びに Terfenadine (CYP3A4) を基質薬物として、Km 値などを算出した。また、Ketoconazole や Miconazole の添加による酵素活性阻害を Ki 値を指標として評価した。次に、*in vitro* 評価系にヒト血清アルブミン (HSA) やラット肝可溶性画分を添加し、各種条件下で薬物の非結合分率 (fu) を平衡透析法で算出し、これを用いて非結合薬物濃度に基づく Km や Ki 値 (以後 Km,u 及び Ki,u と表記する) に換算した。
- 3) Sprague Dawley ラット (雄、7 週令、250-300g) を使い、*In vivo* での MTX と PBD 相互作用の評価を行った。また *In vitro* 実験系として、血中から肝への取り込みには遊離肝細胞、肝から胆汁中への排泄過程の解析には胆管側膜ベシクル (CMV) を用いた。相互作用のモデルとして抗癌剤 methotrexate (MTX) の胆汁排泄に対する Probenecid (PBD) の効果を例にとり、ラットに両薬物

を定速投与することによって実験的に相互作用を起こし、実測された阻害剤濃度と *in vitro* 実験より求められた阻害定数(K_i)から、*in vivo* 相互作用の予測を試みた。

3. 研究成果

- 1) FT から 5-FU への変換活性は、ヒト肝ミクロソームにおいては 45~808 pmol/min/mg protein 未満であり、上清画分においては 23~104 pmol/min/mg protein であった。一方、5'-DFUR から 5-FU への変換活性は、ミクロソームでは 10~160 pmol/min/mg protein 未満であり、上清画分では、1090~5250 pmol/min/mg protein であった。肝ミクロソームにおける FT および 5'-DFUR から 5-FU への変換活性はともに、CYP2A6 依存的活性と考えられる Coumarin 7-水酸化活性と統計的に有意な相関が認められた。肝上清画分による 5'-DFUR から 5-FU への変換活性は Thymidine phospholilase 様活性と統計的に有意な相関が認められた (Table 1)。

Table 1. Formation of 5-FU from FT and microsomal coumarin 7-hydroxylase activity in human livers

Sample	Microsomal		Cytosolic
	FT	Coumarin	
HG 03	430	112	26
HG 06	140	980	72
HG 23	540	740	67
HG 30	313	2380	43
HG 42	645	550	30
HG 43	634	356	23
HG 56	526	2009	76
HG 66	607	264	89
HG 70	808	496	72
HG 89	118	1197	104
HG 93	201	501	63
HG 112	45	244	48

pmol/min/mg protein; FT concentration: 0.5 mM. Correlation coefficient (r value) was 0.763 between microsomal 5-FU formation from FT and coumarin 7-hydroxylase activity.

調製したウサギ腸管ミクロソームにおける P450 の安定性は高かった。腸管に CYP3A の他に CYP1A1、CYP2C、CYP2D の発現を認めた。いずれも十二指腸における含量が肝の 3 割程度と最も多く、空腸、回腸の順に減少した。各々の CYP 活性は腸管各部位に認められ、腸管は薬物代謝器官として十分機能することが示された。腸管には、肝特異的な分子種である CYP1A2 の発現は認められなかった。また、代謝活性に必要なチトクローム b_5 や NADPH-P450 リダクターゼは腸管においても肝とほぼ同程度発現していた。

サル小腸ミクロソームから高い Ebastine hydroxylation 活性を有する P450MI-2 を精製し、内部アミノ酸配列を決定した。得られたアミノ酸配列をもとにデータベース上でホモロジー検索を行った結果、P450MI-2 はヒト CYP4F 分子種と高いホモロジーを示した。発現系ヒト CYP4F より作製した抗ヒト CYP4F 抗体は、サル小腸ミクロソームにおける Ebastine hydroxylation 活性を強く阻害した (Fig. 1)。一方、ヒト小腸ミクロソームの Ebastine hydroxylation 活性に対する抗ヒト CYP4F 抗体の影響は、約 20% 程度とサル小腸ミクロソームに比べ小さかった。

薬物添加が BROD 活性に及ぼす影響について検討した。ヒト recombinant CYP1B1 及び CYP1A1 の K_m 値 (0.02~0.04 μM) は、CYP3A4 と CYP2B6 (2.0~2.7 μM) に比べ非常に低く、また、 V_{max} 値は CYP1B1 > CYP1A1 > CYP2B6、CYP3A4 の順で高かった。一方、ヒト肝ミクロソームでの K_m 値は 0.67 μM であった。BROD 活性は、抗 CYP2B6 及び CYP3A4 抗体により、それぞれ 56~69% 及び 23~44% 阻害された。ヒト肝ミクロソームに α -Naphthoflavone (ANF)、Quinidine、Testosterone 及び Progesterone を添加することにより、活性値は 1.8~3.8 倍に増加した。また、ANF (1~20 μM)

の添加は、Vmax 値のみを濃度依存的に増加させた。更に、ANF、Testosterone、Progesterone の添加は CYP2B6 ではなく、CYP3A4 を用いた時に BROD 活性を増加させた。

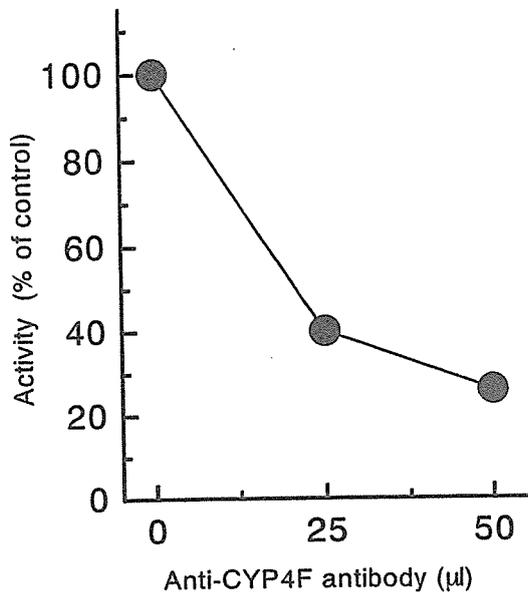


Fig. 1.
Inhibitory effects of anti-CYP4F antibody on ebastine hydroxylation in small intestinal microsomes of monkey

- 2) Maxacalcitol は活性型ビタミン D₃(1 α ,25(OH)₂D₃)の 22 位を酸素に置換した誘導体であり、腎不全に伴う二次性副甲状腺機能亢進症治療薬として開発中の薬物である。これまでに Maxacalcitol の側鎖酸化反応に、ラット腎ミトコンドリア CYP24 が関わっていることを明らかにした。本年度はヒト CYP24 の再構成系による代謝について検討し、ラット CYP24 の場合と比較した。NADPH 未添加およびヒト CYP24 を組み込んでいない発現ベクターでの再構成系では、代謝物の生成は見られなかった。ヒト CYP24 発現系では代謝物である 20S(OH)-hexanor-maxacalcitol、24R(OH)maxacalcitol、24-oxomaxacalcitol の順で生成が認められたのに対し(Fig. 2)。ラット CYP24 発現系では 24R(OH)maxacalcitol、24-oxomaxacalcitol、20S(OH)-hexanor-maxacalcitol の順で生成が認められた。

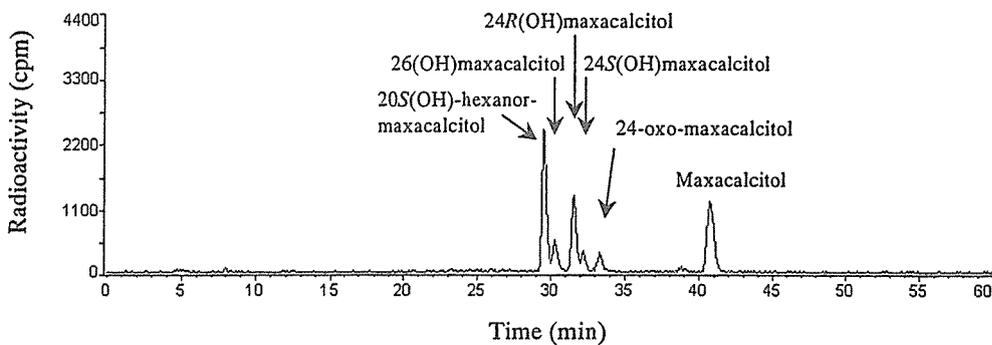


Figure 2 Radio-HPLC chromatograms for [³H]maxacalcitol metabolites formed by recombinant *E.coli* cells producing human mitochondrial CYP24

実験動物として新猿類に属するマーモセットは、繁殖効率が良く小型で取り扱いが容易のみならず、P450のcDNA塩基配列はヒトと約90%の相同性を示した。イヌ、ウサギ、ハムスターやラットより相同性が高くヒトに近いことから、マーモセットの薬物代謝酵素の誘導性について検討した。*in vivo*系において3-Methylcholanthrene (MC)によるCYP1Aの誘導、Phenobarbital (PB)およびRIFによるCYP3A4の誘導が観察されたが、Dexamethasone (DEX)およびPregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN)によるCYP3A誘導およびClofibrateとPerfluorooctanoic acid (PFOA)によるCYP4A誘導は観察されず、P450誘導に関してマーモセットはラットよりもヒトに近い挙動を示した。次に初代培養肝細胞を用いて薬物代謝酵素誘導を検討した。マーモセットではCYP3A4は、RIF(至適濃度; 10 μ M)により明らかに誘導されたが(Fig. 3)、PCN(10~100 μ M)とTroglitazone(1~50 μ M)では誘導は見られなかった。一方、ヒトではCYP3A4は、RIFとTroglitazone(1 μ M)により誘導が観察された。

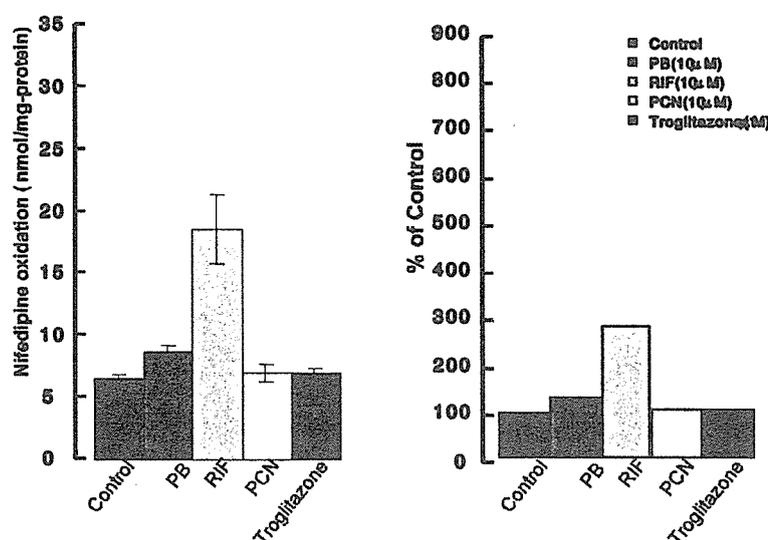


Fig. 3 Activity of nifedipine oxidation in cultured marmoset hepatocytes

PB: Phenobarbital, RIF: Rifampicin, PCN: Pregnenolone-16 α -carbonitrile

Hepatocytes were isolated from marmoset liver, and cultured for 96 hr in the presence of each test substance. The activity for nifedipine oxidation was measured by determination of dehydronifedipine produced after incubation of cultured cells with 10 μ M nifedipine for 60 min. Data are represented as nmol/mg-protein (left panel) and % of control (right panel)

GFJを投与したウサギを用いてNifedipineの体内動態及び薬物代謝能の変動について検討した。NifedipineのC_{max}到達時における血中濃度は、GFJ投与群では非投与群の1.7倍の値を示した。また、およそのAUCは、GFJ投与群では675 ng \cdot hr/mlであり、非投与群の1.2倍となり、GFJがバイオアベイラビリティを向上させていることが示唆された。一方、消失相におけるT_{1/2}は投与群、非投与群で大きな差は認められなかった。この結果は、ヒトでNifedipineに対するGFJの影響として、循環血中AUCが1.3倍となるもののその動態には影響しないとする結果と一致し、ヒトモデルとしてのウサギの有用性が示された。また、これは同時に、GFJが腸管薬物代謝酵素に及ぼす影響について、ウサギでの検討結果が外挿できる可能性を示唆している。以上の結果を踏まえ、肝と腸管のCYP3A酵素活性に与える影響について検討した。GFJ投与によりCYP3A4活性は、腸管では29%にまで減少した。次に、この活性の低下をCYP3A分子種の発現量から検討した結果、GFJ投与により腸管のCYP3A含量は25%まで減少していた。腸管においてCYP3A含量当たりの比活性を求めると、GFJ投与群と非投与群の間に差は認められず(Fig. 4)、Testosterone 6 β -hydroxylation活性の減少は、蛋白量の減少によって引き起こされたことを示し

た。このことが、Nifedipine の循環血中 AUC を上昇させた原因であると推定された。

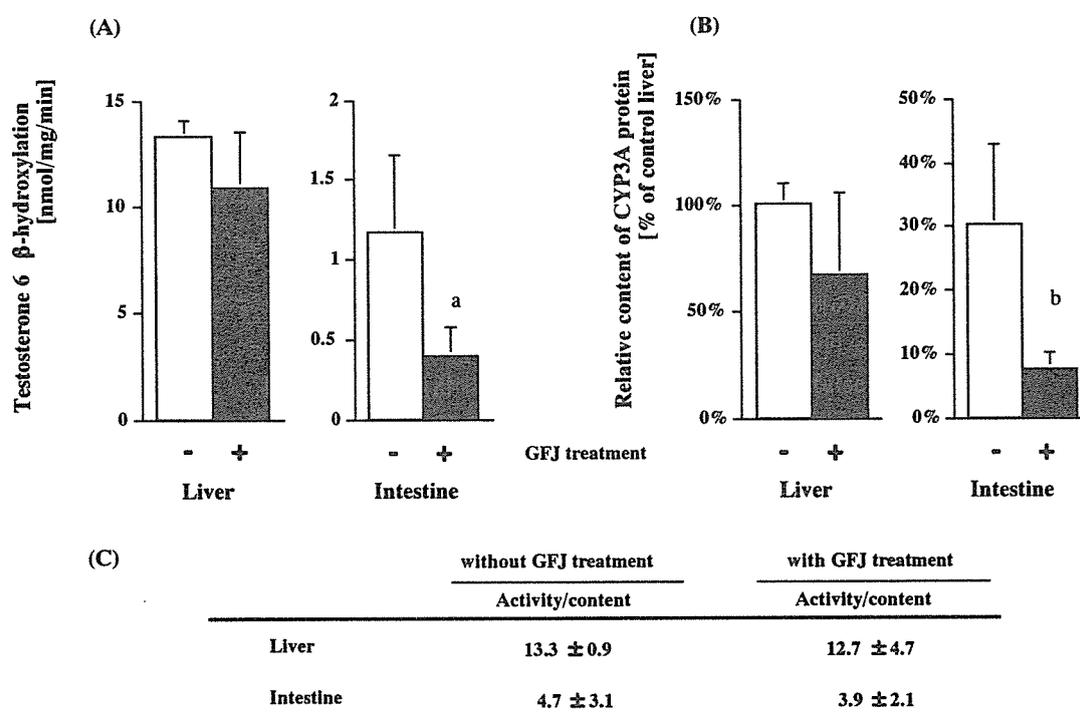


Fig. 4 Effect of pretreatment with grapefruit juice on rabbit intestinal CYP3A

Each value indicates mean \pm standard deviation. Each column indicates 6 β -testosterone hydroxylation activity or CYP3A content of microsomes from rabbit with (closed column) or without (open column) grapefruit juice pretreatment. The character a or b show that p value is less than 0.05 or 0.01, respectively.

次に、ヒト肝ミクロソームを用いる薬物相互作用予測系の構築の一環として、*in vivo* への近視を目指し、アルブミンや肝可溶性画分を反応系に添加することの意義を検討した。Tolbutamide、Diclofenac および Terfenadine の代謝活性に及ぼす HSA および肝可溶性画分の添加の影響を調べた。反応系に HSA もしくはラット肝可溶性画分を添加すると、Terfenadine および Diclofenac の *fu* は減少し、これに伴って酵素活性も減弱した。Diclofenac では、 $K_{m,u}$ はラット肝可溶性画分添加の影響を受けなかったが、それ以外では $K_{m,u}$ が減少し、見かけ上結合している薬物も代謝されることを示した。さらに Miconazole による CYP2C9 の阻害と Ketoconazole による CYP3A4 の阻害に及ぼす影響について調べた。蛋白の添加によりそれぞれの *fu* と阻害能は減少したが、Miconazole ではラット肝可溶性画分を添加した場合に、Ketoconazole では HAS 添加時に、 $K_{i,u}$ が減少し、見かけ上結合している薬物も酵素を阻害することを示した。

- 3) ラット *In vivo* において、MTX の主要な排泄経路は胆汁排泄であり、MTX の胆汁排泄は PBD により阻害された。さらに定常状態下、MTX の肝への取り込み評価により、血液側から肝への取り込み過程も PBD 投与量に依存的して減少することが確認された。*In vitro* 輸送阻害試験においても、ラット遊離肝細胞および CMVs を用いた MTX の取り込み過程、および胆汁への排泄過程ともに、PBD 濃度に依存して阻害された。それぞれ取り込み側および排泄側における MTX のクリアランスの実測値と予測曲線から、予測した値は実測値と近い値を示した。このことから、取り込み側および排泄側を分離して評価した場合には、*in vitro* で評価した K_i および *in vivo* における阻害剤の非結合型濃度から、相互作用の定量的な予測が可能であることが示唆された。しかしながら临床上より重要であるのは、血液側から胆汁側への *net* の輸送クリアランスの減少である。すなわち $CL_{int,bile}$ の定量的予測である。Fig. 5A では、その予測を構築した式を用いて行った結果を示した。また、*net* の輸送における相互作用は、それぞれの膜透過過程における相互作用の積

になると考えている。その考え方に加え、さらに、阻害剤である PBD の肝臓中非結合型濃度（ヒトでの実測が極めて困難）が血漿中の非結合型濃度に等しいと考えて計算すると、いずれのケースでも予測曲線は実測値に近く (Fig. 5A)、本方法によって阻害の定量的予測が可能であることが示唆された。Fig. 5B では、さらに臓器クリアランス（胆汁排泄クリアランス）においても予測を行っている。その結果は Fig. 5A と同様であった。

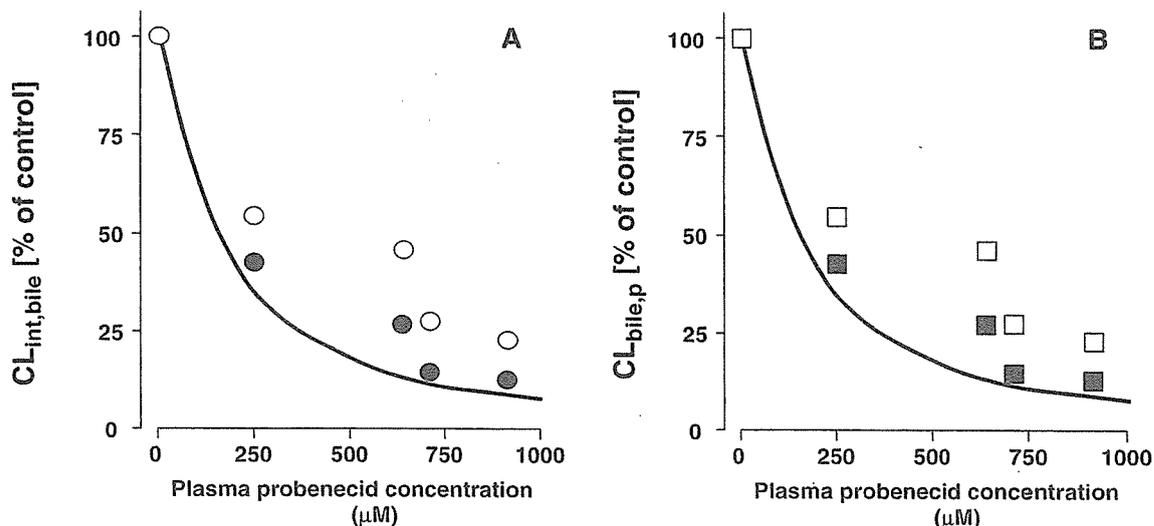


Fig. 5 Extrapolation of the drug interaction involving net biliary excretion from in vitro data
 Panel A: The reduction in the intrinsic clearance for the net biliary excretion ($CL_{int,bile}$) by probenecid was extrapolated based on Eq. (11) where $R_{excretion}$ was estimated using Eq. (10) (●) or (12) (○). The $CL_{int,bile}$ value (○) observed from the steady-state biliary excretion and plasma unbound concentration of methotrexate was normalized by that in the control and also plotted. The $CL_{int,bile}$ of the control was 19.8 ± 1.4 ml/min/kg.
 Panel B: The results for the intrinsic clearance obtained in panel A were converted to the organ clearance. The $CL_{bile,p}$ (□) observed in vivo and that derived from $CL_{int,bile}$ following extrapolation from Eq. (11) and Eq. (10) (■) or Eq. (12) (○) are shown.

4. 考察

経口フッ化ピリミジン系抗がんプロドラッグの FT と 5'-DFUR より、生体内で抗腫瘍活性代謝物 5-FU が徐々に遊離する。肝上清画分のタンパク量が、ミクロソーム画分のタンパク量の約 5 倍であることを考慮すると、FT から 5-FU への変換活性にミクロソーム酵素が主要な役割を果たす検体は、12 検体のうち 8 検体であり、個々のサンプル毎に FT の代謝に関与する主要酵素分子種が異なる可能性が示唆された。5'-DFUR の場合は、12 検体すべてについて上清画分の酵素が重要であった。肝ミクロソームによる FT や 5'-DFUR から 5-FU への変換活性と、CYP2A6 に依存的な活性である Coumarin 7-hydroxylation 活性との間に良い相関が認められた。肝上清酵素による 5'-DFUR から 5-FU への変換活性と Thymidine phospholilase 様活性とは有意に相関した。FT は 5'-DFUR より自然分解速度が速く、血漿中等での分解も考慮に入れ、全体の 5-FU 生成に対する各因子の寄与率を評価することが重要であると思われた。

ウサギ腸管の P450 はラット等に比べ比較的安定であり、実験操作に用いやすいことが明らかとなった。腸管に発現する P450 の含量は肝の 1/3 から 1/4 程度である。一方、腸管での総 P450 当たりのチトクローム b_5 の含量比と NADPH-P450 リダクターゼの発現比は、腸管の P450 が十分な電子の供給を受けることが可能であることを示唆している。未処置のウサギ腸管には、種々の P450 の発現及び代表的な薬物代謝活性も認められた。特に Testosterone 6 β -hydroxylation 活性を有した CYP3A が主要に発現していることについては、これまでのヒトでの報告に近い結果を示した。したがって、ウサギはヒト腸管のモデル、特に CYP3A による薬物代謝活性を検討す

る動物として適していることが示された。ただし、ウサギでは CYP1A1 が腸管で多く発現していることから、ヒトのように腸管に発現している全 P450 中の 70% が CYP3A 分子種であるとする結果とは異なっていた。

サル小腸 P450MI-2 は、アミノ酸配列からヒト CYP4F 分子種と高いホモロジーを示し、CYP4F サブファミリーに属する P450 分子種であることが明らかとなった。Ebastine hydroxylation 活性は抗 CYP4F 抗体より強く阻害され、CYP4F 分子種がサル小腸ミクロソーム中の Ebastine hydroxylation を行う主代謝酵素であることが明らかとなった。一方、ヒト小腸ミクロソームの水酸化活性に対する抗体の影響は小さく、他の酵素の関与が示唆された。

BROD 活性は、ヒト recombinant CYP1B1 で最も高い活性を示し、続いて CYP1A1 > CYP3A4、CYP2B6 の順であった。Km 値はヒト肝ミクロソームに比べ非常に低く、また、ヒト肝ミクロソームにおける活性は、抗 CYP2B6 抗体及び抗 CYP3A4 抗体により阻害された。一方、ヒト肝ミクロソームにおける CYP1A1 及び CYP1B1 含量は極めて少ないことが報告されていることから、ヒト肝ミクロソームの BROD 反応には、主に CYP2B6 及び CYP3A4 の関与が示唆された。また、BROD 反応に及ぼす各種薬物の影響を検討したところ、ANF では濃度依存的な Km 値の増加がみられた。CYP2B6 においては BROD 活性のこの増加は認められなかったが、CYP3A4 では増加したことから、ヒト肝ミクロソームにおける BROD 活性の上昇は、主に CYP3A4 による代謝に対する活性化に起因することを示唆された。

入手したヒト CYP24 発現系から、Maxacalcitol の代謝は CYP24 により触媒されることが確認された。ヒト CYP24 によって生成した代謝物は側鎖開裂型の 20S(OH)-hexanor-maxacalcitol が、側鎖酸化型の 24R(OH)maxacalcitol に比べて優位に生成したのに対し (Fig.1)、ラット CYP24 では 24R(OH)maxacalcitol が 20S(OH)-hexanor-maxacalcitol に比べて優位に生成した。CYP24 は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を 23 位あるいは 24 位を酸化することに始まる逐次代謝経路で代謝することが知られている。ヒト CYP24 では 23 位水酸化経路も弱いながら触媒することが知られており、Maxacalcitol が同様な代謝経路によって代謝されることを想定すると、23 位水酸化が起こると非酵素的に開裂反応が起こり、20S(OH)-hexanor-maxacalcitol が生成するものと考えられる。また、ヒト CYP24 において 24R(OH)maxacalcitol に比べて 20S(OH)-hexanor-maxacalcitol が優位に生成したのは、ヒト CYP24 の 23 位水酸化経路の触媒活性に由来するものと考えられる。

ヒトにおいては、肝臓 P450 分子種のうち CYP3A4 の割合が最も多く、総 P450 の約 30% を占める。よって、ヒトにおける薬物相互作用を含んだ薬物動態研究には、P450 の中でも、特に CYP3A が非常に重要視されている。Rifampicin は臨床においても CYP3A の誘導による薬物相互作用が報告されているが、この薬物ではラットでは CYP3A が誘導されない。したがって rifampicin のような薬物による CYP3A4 の誘導作用は、初代培養マーマーセット肝細胞が有効に利用できるであろうと考えられた。一方、troglitazone (1 μM) はヒト培養肝細胞では CYP3A4 を誘導したのに対してマーマーセット培養肝細胞では誘導能を示さなかった。高濃度の troglitazone では両培養肝細胞とも細胞毒性を示し、誘導を観察することはできなかった。高濃度で細胞毒性を示す化合物では、ヒトおよびマーマーセット遊離肝細胞の感受性が異なるために、同様な結果が得られなかったものと考えられた。

GFJ の作用として広く知られている薬物代謝酵素阻害は、主にフラノクマリン誘導体による、いわゆる自殺基質による酵素阻害であると考えられている。仮に腸管ミクロソームにこの不活性化された CYP3A が存在していた場合、CYP3A 含量当たりの Testosterone 6β -hydroxylation 活性は GFJ 投与群で低下していることが考えられる。しかし今回、投与群と非投与群の間で差は認められなかった。このことは、活性を失ったタンパクが速やかに分解されたか、GFJ に含まれる何らかの成分により CYP3A の発現が抑制されたか、若しくはその両方が起きていることが考えられる。腸管上皮細胞はターンオーバーの速い組織であることから、GFJ の影響を受けたタンパクが細胞ごと剥離した可能性もあるが、それでは CYP3A 含量の低下の説明としては不十分である。GFJ の作用は、ここでの代謝に関与する腸管上皮細胞の CYP3A 含量を減少させることが示された。

一方、従来代謝反応や酵素阻害には非結合型の薬物のみが利用されると考えられてきたが (フリー理論)、今回の結果から、検討した事例の中では非結合型の薬物のみならず、見かけ上タン

パク質に結合した薬物が代謝を受ける場合や酵素を阻害する場合のあることが明らかになった。特に、肝可溶性画分についてのデータは、初めての知見である。アルブミンは生理的条件下では肝細胞中の薬物代謝酵素には接触していないので、肝細胞中の成分でも、このような現象が観察されることを証明できたことは、外挿予測を論じる上では重要なことである。ただし、すべての事例でタンパクに結合している薬物が利用される訳ではなく、何らかの支配的要因があるものと推察されるが、いまのところ、そのメカニズムの詳細については明らかではない。

本研究では胆汁排泄過程における相互作用の予測方法の確立を目的として、血液側からの肝細胞への取り込みを遊離肝細胞、肝細胞から胆汁への排泄を CMV を用い、それぞれ阻害の程度を評価した。そこから得られた K_i を用い、*in vivo* での排泄阻害の程度を予測するため、別途 *in vivo* においても相互作用のモデルを構築したところ、PBD は MTX の胆汁排泄および肝取り込みを投与量依存的に低下させたことから、モデルの構築が確認された。取り込み側、排泄側の個々の膜透過過程については、*in vitro* で測定した K_i を用い定量的な予測が可能であることが明らかとなった。さらに構築した式を用いることにより、*net* の胆汁排泄についても少なくとも *false negative* な予測を避けるという観点からの予測が可能である。 $CL_{bile,p}$ の阻害の程度は、どのようなケースであっても、取り込み側の阻害の程度と排泄側の阻害の程度の積よりも顕著であることはなく、実際、このようにして予測された $CL_{int,bile}$ は実測値を過小評価すること（相互作用を実際よりも起こると予測してしまうこと）はあっても、過大評価すること（相互作用があるにもかかわらず、ないと予測してしまうこと）はなく (Fig. 5)、 $CL_{int,bile}$ の予測が可能となった。構築した式を用いる問題点として、阻害剤の肝臓中非結合型濃度の必要な点が挙げられるが、これはヒトにおいては得るのが困難な情報である。そこで、血漿中の非結合型濃度を用いて予測を行ったところ、このケースでも予測値は実測値に近く、予測の妥当性が示唆された。これは PBD の非結合型濃度が血漿中と肝細胞内とでさほど違いがないことに起因している。しかし阻害剤によっては、肝細胞内に能動輸送によって濃縮されている可能性もある。肝細胞内の非結合型濃度の予測には定数倍のマージンをつけることも必要かもしれない。この点については昨年度の本研究において扱った代謝過程における相互作用の予測においても同様な問題である。今後、ヒト肝細胞において各種薬物がどの程度細胞内に濃縮しているかを網羅的に研究していく必要があると考える。

5. まとめ

- 1) 12 人の白人由来の肝ミクロソーム、上清画分を用いて、FT、5'-DFUR のフッ化ピリミジン系抗がんプロドラッグからの 5-FU への変換活性に肝ミクロソーム CYP2A6 の寄与を示した。FT では生体内での自然分解の考慮が必要と思われた。5'-DFUR では腫瘍と同様、肝 Thymidine phospholilase 様活性の寄与が重要であると考えられた。ウサギはヒト腸管のモデル、特に CYP3A による薬物代謝活性を検討する動物として適していることが示された。一方、サル小腸ミクロソームから Ebastine hydroxylation 活性をもとに精製した P450 (P450MI-2) は、CYP4F サブファミリーに属する分子種であることを明らかにした。CYP4F 分子種は、サル小腸ミクロソームによる Ebastine hydroxylation を行う主代謝酵素であることを明らかにした。一方、ヒト小腸ミクロソームの Ebastine hydroxylation 活性に対する抗体の影響は小さく、CYP4F 以外の酵素の関与が示唆された。7-Benzyloxyresorufin のヒト肝ミクロソームによる *O*-dealkylation 活性反応を recombinant CYP 及び特異抗体を用いて検討したところ、主に CYP2B6 及び CYP3A4 により代謝されることが示唆された。また、ANF、testosterone、progesterone 等を添加することによりヒト肝ミクロソームにおける活性値が増加し、この現象は主に CYP3A4 による代謝に対する活性化に起因することが示された。
- 2) Maxacalcitol の側鎖酸化型代謝および側鎖開裂型代謝は、ヒト CYP24 により起こることを明らかにした。臨床において CYP3A4 の誘導を引き起こすことが知られている RIF および PB はマーモセットを用いた場合 *in vivo* および *in vitro* (初代培養肝細胞) でも CYP3A 活性を誘導することが示された。一方、ラット CYP3A の誘導剤である PCN および DEX ならびに CYP4A の誘導剤である PFOA は誘導を起こさないことが *in vivo* で示された。したがって薬物による薬物代

謝酵素誘導の研究に、マーモセットがヒトに近い動物種として使用できる可能性が示された。初代培養肝細胞を用いれば、パラツキの少ない実験が行え、かつ複数の薬物の相互比較が可能であるので、初代培養マーモセット肝細胞系は有用な実験系であると考えられた。一方、細胞毒性を示す薬物についてはヒト肝細胞とマーモセット肝細胞の感受性の差により同じ結果が得られない場合があることに注意すべきであることが判明した。腸管の CYP3A 阻害が関与するヒトにおける GFJ と Nifedipine との薬物相互作用の予測に、ウサギ腸管をヒト腸管代謝モデルとして用いることの有用性が認められた。また、この系により GFJ が腸管 CYP3A の蛋白量を減少させることで、薬物のバイオアベイラビリティーを増加させることが明らかとなった。これまで、臨床での酵素阻害の影響の程度を予測する際には、非結合型薬物濃度に基づくレスポンスを外挿してきたが、今後は、これだけではなく、補正項的に、結合型薬物の寄与も考慮する必要のある場合があることを明らかにした。今後はこの点が外挿予測性の向上に、どの程度関与し得るか明らかにしたい。引き続き、遊離肝細胞の実験系での検討も企画している。

- 3) 本研究では肝トランスポーターレベルでの薬物間相互作用を、血管側膜と胆管側膜とに分けて、個々に検討し予測を試みた。遊離肝細胞および CMV を用いた検討を *in vivo* に積み上げることによって、*false negative* な予測を避けるという観点からの定量的な予測が可能であることが明らかとなった。しかしながら、本研究の結論の検証のため、さらなる相互作用の組み合わせを用いた検討が望まれる。またそれぞれの膜透過過程がどのトランスポーター分子によって主に行われているかを明らかにすることも重要と考えられる。輸送機構を明らかとすれば、トランスポーター遺伝子発現系を用いた新たな相互作用予測の手法も可能となることが期待される。

6. 研究成果

- 1) Y. Han, Y. Kato, M. Haramura, M. Ohta, H. Matsuoka, and Y. Sugiyama : Physicochemical parameters responsible for the affinity of methotrexate analogs to rat canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *Pharm. Res.*, in press.
- 2) Y. Han, Y. Kato, Y. Watanabe, K. Terao, Y. Asoh, and Y. Sugiyama : Carrier-mediated hepatobiliary transport of a novel antifolate, N-[4-[(2,4-diaminopteridine-6-yl)methyl]-3,4-dihydro-2H-1,4-benzothiazin-7-yl]carbonyl-L-homoglutamic acid, in rats. *Drug Metab. Dispos.*, 29(4), in press.
- 3) K. Ueda, Y. Kato, K. Komatsu, and Y. Sugiyama : Inhibition of the biliary excretion of methotrexate by probenecid in rats: Quantitative prediction of the interaction from *in vitro* data. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press.
- 4) Takahiko Baba, A. Touchi, Y. Yamaguchi, K. Ito, Y. Yamazoe, Y. Sugiyama and Y. Ohno, Can *in vitro* metabolism and enzyme inhibition be explained by unbound drug concentration?, *Drug metabolism Reviews*, 32(suppl.2), p.222 (2000).

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社