

- (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* **32**:1201-1208.
- Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD and Wrighton SA (2002) Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos* **30**:883-891.
- Winship LC, McKenney JM, Wright JT, Jr., Wood JH and Goodman RP (1985) The effect of ranitidine and cimetidine on single-dose diltiazem pharmacokinetics. *Pharmacotherapy* **5**:16-19.
- Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, Chang Z and Woolsey J (2006) DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res* **34**:D668-672.
- Wong M, Balleine RL, Collins M, Liddle C, Clarke CL and Gurney H (2004) CYP3A5 genotype and midazolam clearance in Australian patients receiving chemotherapy. *Clin Pharmacol Ther* **75**:529-538.
- Wong YW, Yeh C and Thyrum PT (2001) The effects of concomitant phenytoin administration on the steady-state pharmacokinetics of quetiapine. *J Clin Psychopharmacol* **21**:89-93.
- Wrighton SA and Stevens JC (1992) The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* **22**:1-21.
- Wu CY, Benet LZ, Hebert MF, Gupta SK, Rowland M, Gomez DY and Wachter VJ (1995) Differentiation of absorption and first-pass gut and hepatic metabolism in humans: studies with cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* **58**:492-497.
- Yamano K, Yamamoto K, Katashima M, Kotaki H, Takedomi S, Matsuo H, Ohtani H, Sawada Y and Iga T (2001) Prediction of midazolam-CYP3A inhibitors interaction in the human liver from in vivo/in vitro absorption, distribution, and metabolism data. *Drug Metab Dispos* **29**:443-452.
- Yamazaki H, Inoue K, Shaw PM, Checovich WJ, Guengerich FP and Shimada T (1997) Different contributions of cytochrome P450 2C19 and 3A4 in the oxidation of omeprazole by human liver microsomes: effects of contents of these two forms in individual human samples. *J Pharmacol Exp Ther* **283**:434-442.
- Yang J, Tucker GT and Rostami-Hodjegan A (2004) Cytochrome P450 3A expression and activity in the human small intestine. *Clin Pharmacol Ther* **76**:391.
- Yano JK, Wester MR, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD and Johnson EF (2004) The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *J Biol Chem* **279**:38091-38094.
- Yao C, Kunze KL, Kharasch ED, Wang Y, Trager WF, Ragueneau I and Levy RH (2001)

- Fluvoxamine-theophylline interaction: gap between in vitro and in vivo inhibition constants toward cytochrome P4501A2. *Clin Pharmacol Ther* **70**:415-424.
- Yasui-Furukori N, Saito M, Inoue Y, Niioka T, Sato Y, Tsuchimine S and Kaneko S (2007) Terbinafine increases the plasma concentration of paroxetine after a single oral administration of paroxetine in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* **63**:51-56.
- Yasui-Furukori N, Saito M, Uno T, Takahata T, Sugawara K and Tateishi T (2004a) Effects of fluvoxamine on lansoprazole pharmacokinetics in relation to CYP2C19 genotypes. *J Clin Pharmacol* **44**:1223-1229.
- Yasui-Furukori N, Takahata T, Nakagami T, Yoshiya G, Inoue Y, Kaneko S and Tateishi T (2004b) Different inhibitory effect of fluvoxamine on omeprazole metabolism between CYP2C19 genotypes. *Br J Clin Pharmacol* **57**:487-494.
- Yeates RA, Laufen H and Zimmermann T (1996) Interaction between midazolam and clarithromycin: comparison with azithromycin. *Int J Clin Pharmacol Ther* **34**:400-405.
- Yin OQ, Tomlinson B and Chow MS (2005) CYP2C9, but not CYP2C19, polymorphisms affect the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyburide in Chinese subjects. *Clin Pharmacol Ther* **78**:370-377.
- Yu KS, Yim DS, Cho JY, Park SS, Park JY, Lee KH, Jang IJ, Yi SY, Bae KS and Shin SG (2001) Effect of omeprazole on the pharmacokinetics of moclobemide according to the genetic polymorphism of CYP2C19. *Clin Pharmacol Ther* **69**:266-273.
- Yumibe N, Huie K, Chen KJ, Snow M, Clement RP and Cayen MN (1996) Identification of human liver cytochrome P450 enzymes that metabolize the nonsedating antihistamine loratadine. Formation of descarboethoxyloratadine by CYP3A4 and CYP2D6. *Biochem Pharmacol* **51**:165-172.
- Zhu M, Zhao W, Jimenez H, Zhang D, Yeola S, Dai R, Vachharajani N and Mitroka J (2005) Cytochrome P450 3A-mediated metabolism of buspirone in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **33**:500-507.
- Zimmermann T, Yeates RA, Laufen H, Scharpf F, Leitold M and Wildfeuer A (1996) Influence of the antibiotics erythromycin and azithromycin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of midazolam. *Arzneimittelforschung* **46**:213-217.

Table 1a. Typical substrate, inhibitor and inducer drugs of CYP involved in significant pharmacokinetic drug-drug interaction in human

substrate		inhibitor		inducer	
CYP1A2					
tizanidine	(Granfors et al 2004b; Granfors et al 2004a)	fluvoxamine	(Yao et al 2001; Granfors et al 2004a)	tobacco	(Parsons & Neims 1978)
theophylline	(Yao et al 2001)	ciprofloxacin	(Granfors et al 2004b)		
ropinirole	(Kaye & Nicholls 2000)	enoxacin	(Wijnands et al 1986; Takagi et al 1988)		
		grepafloxacin	(Efthymiopoulos et al 1997)		
		troleandomycin	(Naline et al 1988)		
		rofecoxib	(Backman et al 2006)		
		contraceptive	(Granfors et al 2005)		
CYP2C8					
cerivastatin	(Backman et al 2002)	gemfibrozil	(Backman et al 2002; Deng et al 2005)		
pioglitazone	(Deng et al 2005)				
repaglinide	(Tomio et al 2008)				
CYP2C9					
warfarin	(O'Reilly et al 1992; Black et al 1996)	fluconazole	(Black et al 1996)	rifampicin	(Heimark et al 1987)
phenytoin	(Blum et al 1991)	miconazole	(O'Reilly et al 1992)		
ibuprofen	(Garcia-Martin et al 2004)	sulphaphenazole	(Back et al 1988)		
celecoxib	(celecoxib product label)	amiodarone	(O'Reilly et al 1987)		
diclofenac	(Transon et al 1995)	bucolome	(Takahashi et al 1999b)		
tolbutamide	(Back et al 1988; Veronese et al 1990)	benzbromarone	(Takahashi et al 1999a)		
glimepiride	(Niemi et al 2001)				
glibenclamide	(Kirchheiner et al 2002a; Yin et al 2005)				
natiglinide	(Kirchheiner et al 2004)				
fluvastatin	(Kantola et al 2000)				
CYP2C19					
omeprazole	(Yasui-Furukori et al 2004b; Ieiri et al 2005)	ticlopidine	(Ieiri et al 2005)	ritonavir	(voriconazole product label)
lansoprazole	(Yasui-Furukori et al 2004a)	fluvoxamine	(Yasui-Furukori et al 2004b)	rifampicin	(voriconazole product label)
rabeprazole	(Uno et al 2006)	voriconazole	(voriconazole product label)	rifabutin	(voriconazole product label)
diazepam	(Wan et al 1996)				
etizolam	(Fukasawa et al 2005)				
voriconazole	(voriconazole product label)				
sertraline	(Rudberg et al 2008)				
clopidogrel*	(Mega et al 2008)				

It is estimated that the exposure of substrate drugs will be significantly changed with coadministration of a corresponding inhibitor or inducer drug at its clinical dose. The authors adopted the associating references as a basis of the estimation. All the references were reported based on *in vivo* clinical study.

*: A pharmacologically active metabolite is generated from the non-active parent drug by the corresponding CYP.

Table 1b. Typical substrate, inhibitor and inducer drugs of CYP involved in significant pharmacokinetic drug-drug interaction in human

substrate		inhibitor		inducer
CYP2D6				
amitriptyline	(Baumann et al 1986)	paroxetine	(Brosen et al 1993; Alderman et al 1997)	(CYP2D6 is not inducible)
imipramine	(Spina et al 1993)	fluoxetine	(Bergstrom et al 1992)	
clomipramine	(Nielsen et al 1994)	terbinafine	(Yasui-Furukori et al 2007)	
desipramine	(Brosen et al 1993; Alderman et al 1997)	quinidine	(Brosen & Gram 1989)	
nortriptyline	(Dalen et al 1998)	cinacalcet	(Nakashima et al 2007)	
trimipramine	(Kirchheiner et al 2003)	celecoxib	(Werner et al 2003)	
maprotiline	(Firkusny & Gleiter 1994)			
doxepine	(Kirchheiner et al 2002b)			
perphenazine	(Ozdemir et al 1997)			
paroxetine	(Sindrup et al 1992)			
timolol	(Edeki et al 1995)			
propranolol	(Kowey et al 1989)			
metoprolol	(Hemeryck et al 2000)			
flecainide	(Funck-Brentano et al 1994)			
encainide	(Funck-Brentano et al 1989b)			
propafenone	(Funck-Brentano et al 1989a)			
dextromethorphan	(Pope et al 2004)			
tolterodine	(Bryne et al 1999)			
tropisetron	(Kim et al 2003)			
tamoxifen*	(Stearns et al 2003)			
<hr/>				
CYP3A4				
alprazolam	(Greenblatt et al 1998b)	itraconazole	(Oikkola et al 1994; Ahonen et al 1995; Oikkola et al 1996; Neuvonen et al 1998)	rifampicin
midazolam	(Oikkola et al 1994; Ahonen et al 1995; Oikkola et al 1996; Backman et al 1998)	ketoconazole	(Oikkola et al 1994; Tsunoda et al 1999; Lam et al 2003; Chung et al 2006)	rifabutin
triazolam	(Varhe et al 1994; von Moltke et al 1996; Greenblatt et al 1998a)	voriconazole	(Saari et al 2006)	phenobarbital
brotizolam	(Osanai et al 2004)	miconazole	(Hynninen et al 2009)	phenytoin
simvastatin	(Kantola et al 1998b; Neuvonen et al 1998)	fluconazole	(Oikkola et al 1996)	carbamazepine
	(Neuvonen & Jalava 1996; Kivisto et al 1998)	erythromycin	(Oikkola et al 1993; Zimmermann et al 1996)	efavirenz
lovastatin	(Kantola et al 1998a; Mazzu et al 2000)	clarithromycin	(Yeates et al 1996; Gorski et al 1998)	st. john's wort
	[ergotamine product label]	troleandomycin	(Warot et al 1987)	
atorvastatin	[dihydroergotamine product label]	telithromycin	(telithromycin product label)	
ergotamine	(Nelson et al 1990)			
dihydroergotamine	(Christensen et al 2002)			
bromocriptine	(Heinig et al 1999)			
cabergoline	(Tateishi et al 1989)			

(continue)

It is estimated that the exposure of substrate drugs will be significantly changed with coadministration of a corresponding inhibitor or inducer drug at its clinical dose. The authors adopted the associating references as a basis of the estimation. All the references were reported based on *in vivo* clinical study.

*: A pharmacologically active metabolite is generated from the non-active parent drug by the corresponding CYP.

Table 1c. Typical substrate, inhibitor and inducer drugs of CYP involved in significant pharmacokinetic drug-drug interaction in human

substrate		inhibitor	inducer
CYP3A4 (continued)			
nisoldipine	(Heinig et al 1999)	ritonavir	(ritonavir product label)
nifedipine	(Tateishi et al 1989)	saquinavir	(Palkama et al 1999)
felodipine	(Jalava et al 1997)	nelfinavir	(nelfinavir product label)
azelnidipine	(azelnidipine product label)	indinavir	(indinavir product label)
nimodipine	(Muck et al 1992)	atazanavir	(atazanavir product label)
verapamil	(Ho et al 2000)	diltiazem	(Backman et al 1994)
diltiazem	(Winship et al 1985)	verapamil	(Backman et al 1994)
blonanserin	(blonanserin product label)	nefazodone	(Lam et al 2003)
pimozido	(Desta et al 1999)	cimetidine	(Elliott et al 1984)
quetiapine	(Grimm et al 2006)	grapefruit juice	(Kantola et al 1998c; Veronese et al 2003)
bupirone	(Kivisto et al 1999)		
cyclosporin	(Butman et al 1991; Gomez et al 1995; Foradori et al 1998)		
tacrolimus	(Floren et al 1997)		
sirolimus	(Thomas et al 2004)		
everolimus	(Kovarik et al 2005)		
imatinib	(Dutreix et al 2004)		
gefitinib	(Swaisland et al 2005)		
erlotinib	[erlotinib product label]		
nilotinib	[nilotinib product label]		
dasatinib	[dasatinib product label]		
vincristine	(Bohme et al., 1995)		
vinblastine	(Bashir et al., 2006)		
vinorelbine	(Bosque, 2001)		
irinotecan	[irinotecan product label]		
epiorenone	(Cook et al 2004)		
eletriptan	[eletriptan product label]		
sildenafil	(Muirhead et al 2002)		
vardenafil	(vardenafil product label)		
silodosin	(Shimizu et al 2006)		
solifenacin	(Swart et al 2006)		
cisapride	(Offman et al 2001)		
prednisolone	(Varis et al 2000b)		
methylprednisolone	(Varis et al 1998; Lebrun-Vignes et al 2001)		
dexamethasone	(Varis et al 2000a)		
budesonide	(Seidegard 2000)		
fluticasone	(Foisy et al 2008)		
ciclesonide	(Bohmer et al 2008)		

It is estimated that the exposure of substrate drugs will be significantly changed with coadministration of a corresponding inhibitor or inducer drug at its clinical dose. The authors adopted the associating references as a basis of the estimation. All the references were reported based on *in vivo* clinical study

Table 2. Contribution of CYP species to metabolism and to drug-drug-interactions

CYP species	contribution to metabolism* ¹	expression in liver* ²	Japanese package insert			PubMed		
			hit* ³	frequency	cumulative	hit* ⁴	frequency	cumulative
3A4	48%	20%	902	46%	46%	54	31%	31%
2D6	21%	2%	287	15%	60%	34	20%	51%
1A2	7%	8%	290	15%	75%	18	10%	61%
2C9	9%	18%	233	12%	87%	19	11%	72%
2C19	6%	4%	154	8%	94%	22	13%	85%
2C8	5%	12%	57	3%	97%	11	6%	91%
2E1	1%	9%	27	1%	99%	9	5%	97%
2B6	-	-	13	1%	99%	1	1%	97%
3A5	-	-	9	0%	100%	1	1%	98%
2A6	3%	12%	4	0%	100%	1	1%	98%
1A1	-	-	0	0%	100%	2	1%	99%
2J2	-	-	0	0%	100%	1	1%	100%

References: *1 Rodrigues (1999), *2 Clarke et al. (2002).

*3 The name of CYP was used as a key word for the search in the drug-drug-interaction sections.

*4 The name of CYP, "drug interaction", and "pharmacokinetics" were used as key words.

Table 3. Calculated ratio of contribution of CYP3A4 to the oral clearance for substrates (CR_{CYP3A4}) and ratio of inhibition of CYP3A4 for inhibitors (IR_{CYP3A4})

class	substrates	CR_{CYP3A4}			inhibitors	IR_{CYP3A4}		
		calculated	MPE*	RMSE**		calculated	MPE*	RMSE**
very selective/ strong	simvastatin	1	-0.119	0.18	ketoconazole	1.00	0.058	0.28
	lovastatin	1	0.140	0.22	voriconazole	0.98	0.499	0.71
	bupiron	0.99	-0.118	0.23	itraconazole	0.95	0.006	0.29
	nisoldipine	0.96	0.076	0.11	telithromycin	0.91	0.007	0.01
	triazolam	0.93	0.063	0.40				
	midazolam	0.92	0.033	0.21				
selective/ strong	felodipine	0.89	0.198	0.28	clarithromycin	0.88	-0.037	0.41
	cyclosporin	0.8	0.315	0.45	saquinavir	0.88	0.000	0.00
					nefazodone	0.85	0.292	0.40
					erythromycin	0.82	0.188	0.32
				diltiazem	0.80	0.188	0.34	
slightly selective/ strong	nifedipine	0.78	0.010	0.21	fluconazole	0.79	0.079	0.21
	alprazolam	0.75	-0.017	0.31	verapamil	0.71	-0.089	0.16
moderate	atorvastatin	0.68	0.022	0.36				
weak	telithromycin	0.49	0.116	0.14	cimetidine	0.44	0.047	0.17
	zolpidem	0.4	0.128	0.16	ranitidine	0.37	0.104	0.17
				roxithromycin	0.35	0.038	0.05	
				fluvoxamine	0.30	-0.082	0.19	
very weak	cerivastatin	0.18	0.043	0.11	azithromycin	0.11	0.038	0.14
				gatifloxacin	0.08	0.000	0.00	

* mean prediction error = $\frac{1}{n} \sum (\text{Predicted} - \text{Observed})$

** root mean square prediction error = $\sqrt{\frac{1}{n} \sum (\text{Predicted} - \text{Observed})^2}$

Results were taken from Ohno et al. (2007).

Table 4. Calculated apparent increase in CYP3A4 clearance by inducers (IC_{CYP3A4})

inducers	IC _{CYP3A4}		
	calculated	MPE*	RMSE**
rifampicin	7.7	0.008	0.06
phenytoin	4.7	-0.075	0.11
carbamazepine	3.0	-0.031	0.09
efavirenz	1.4	0.001	0.08
st. john's wort	1.2	-0.029	0.04
bosentan	0.5	0.093	0.13
pioglitazone	0.4	-0.079	0.10

* mean prediction error = $\frac{1}{n} \sum (\text{Predicted} - \text{Observed})$

** root mean square prediction error = $\sqrt{\frac{1}{n} \sum (\text{Predicted} - \text{Observed})^2}$

Results were taken from Ohno et al. (2008).

Note that the CL_{int} of CYP3A4 is increased to 8.7- and 1.4-fold with IC_{CYP3A4} values of 7.7 and 0.4 for rifampicin and pioglitazone, respectively.

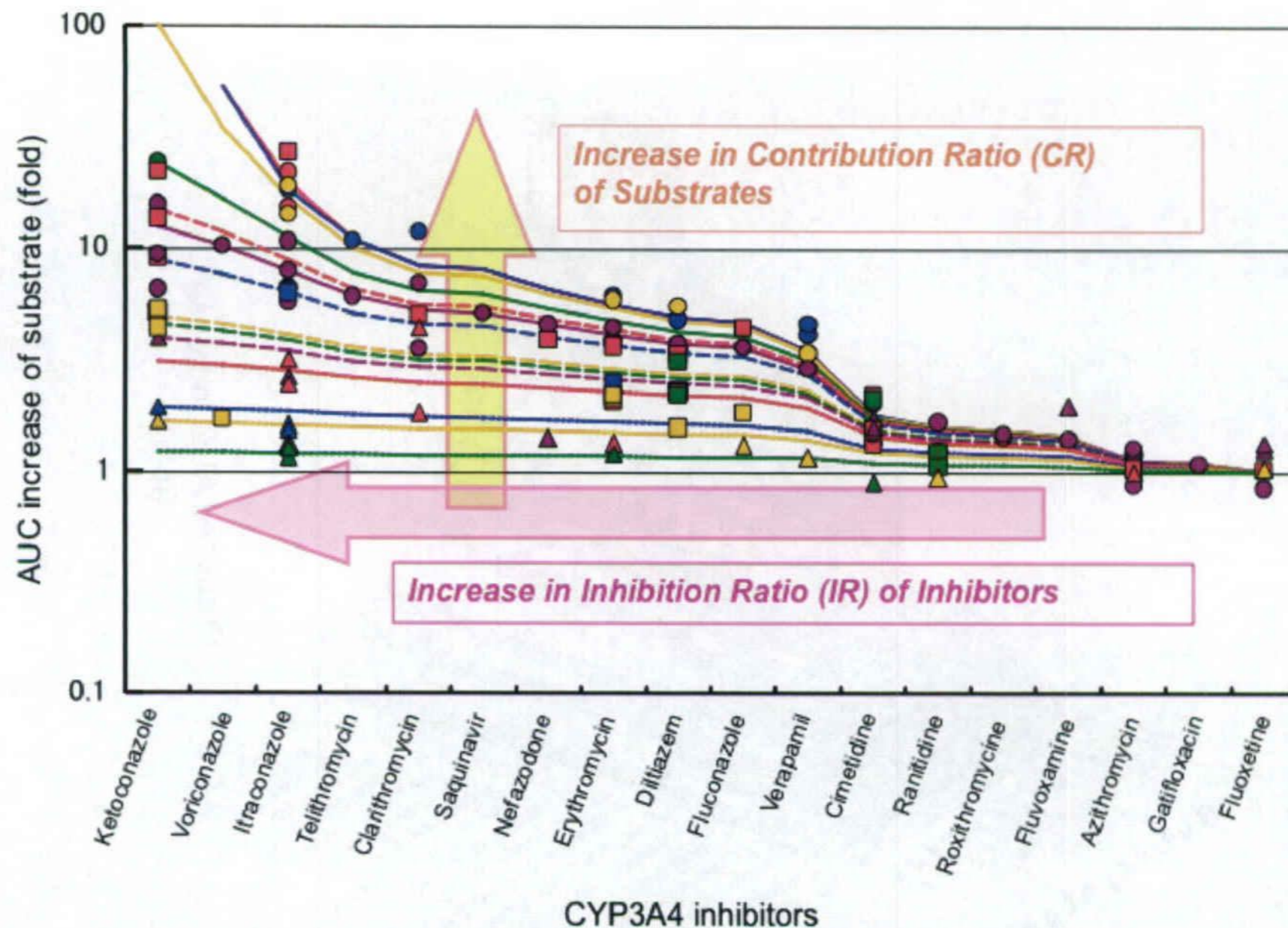


Figure 1. General concept of the *in-vivo* based prediction of AUC increases caused by inhibition of CYP3A4. AUC increases of 14 substrates from 113 studies reported in 78 manuscripts from 1986 to 2006 were plotted versus 18 co-administered inhibitors of CYP3A4. Those manuscripts were cited in Ohno et al. (2007). The dosage of the inhibitor is indicated in Fig. 2. The lines are drawn according to predicted AUC increases calculated with Eq. 4. The colors of symbols and lines are as follows: lovastatin (red), simvastatin (blue), buspirone (orange), nisoldipine (green), midazolam (violet), triazolam (red), felodipine (blue), cyclosporin (orange), nifedipine (green), alprazolam (violet), atorvastatin (red), terithromycin (blue), zolpidem (orange), and cerivastatin (green). In the same order, lovastatin to midazolam, triazolam to alprazolam, and atorvastatin to cerivastatin are plotted with circles and straight lines, squares and break lines, and triangles and dotted lines, respectively.

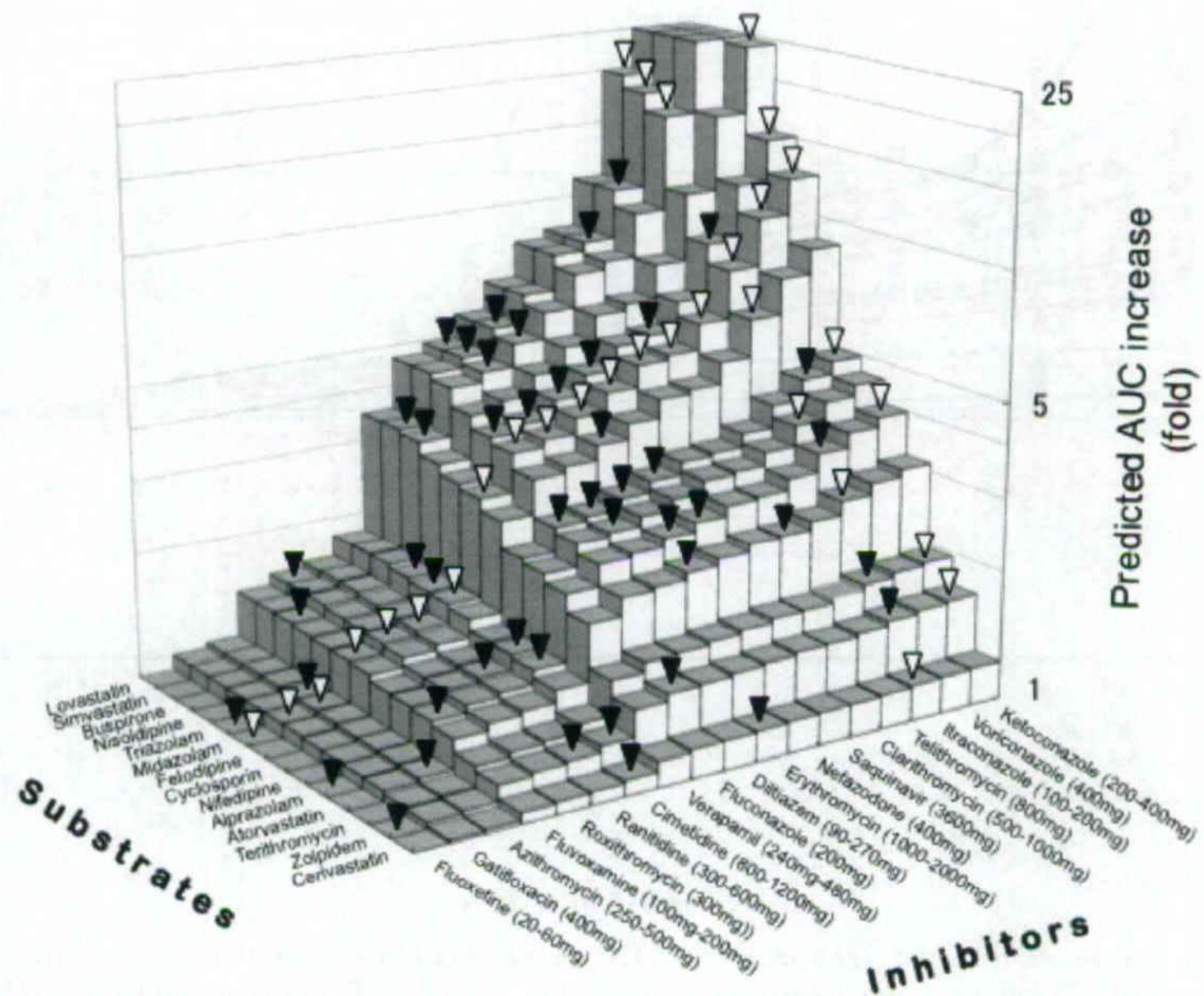


Figure 2. Systematic prediction of AUC increases by DDIs mediated by inhibition of CYP3A4. AUC increases were predicted from CR and IR values using Eq. 4. Bars with open triangles indicate the data used for calculation of the CR and IR values, whereas bars with closed triangles indicate the data used for validation of the prediction with the observed AUC increase. The predicted AUC fold-increases of 95% were within 50~200% of the observed values. Bars without any symbol indicate combinations for which pharmacokinetic data are unavailable in the literature.

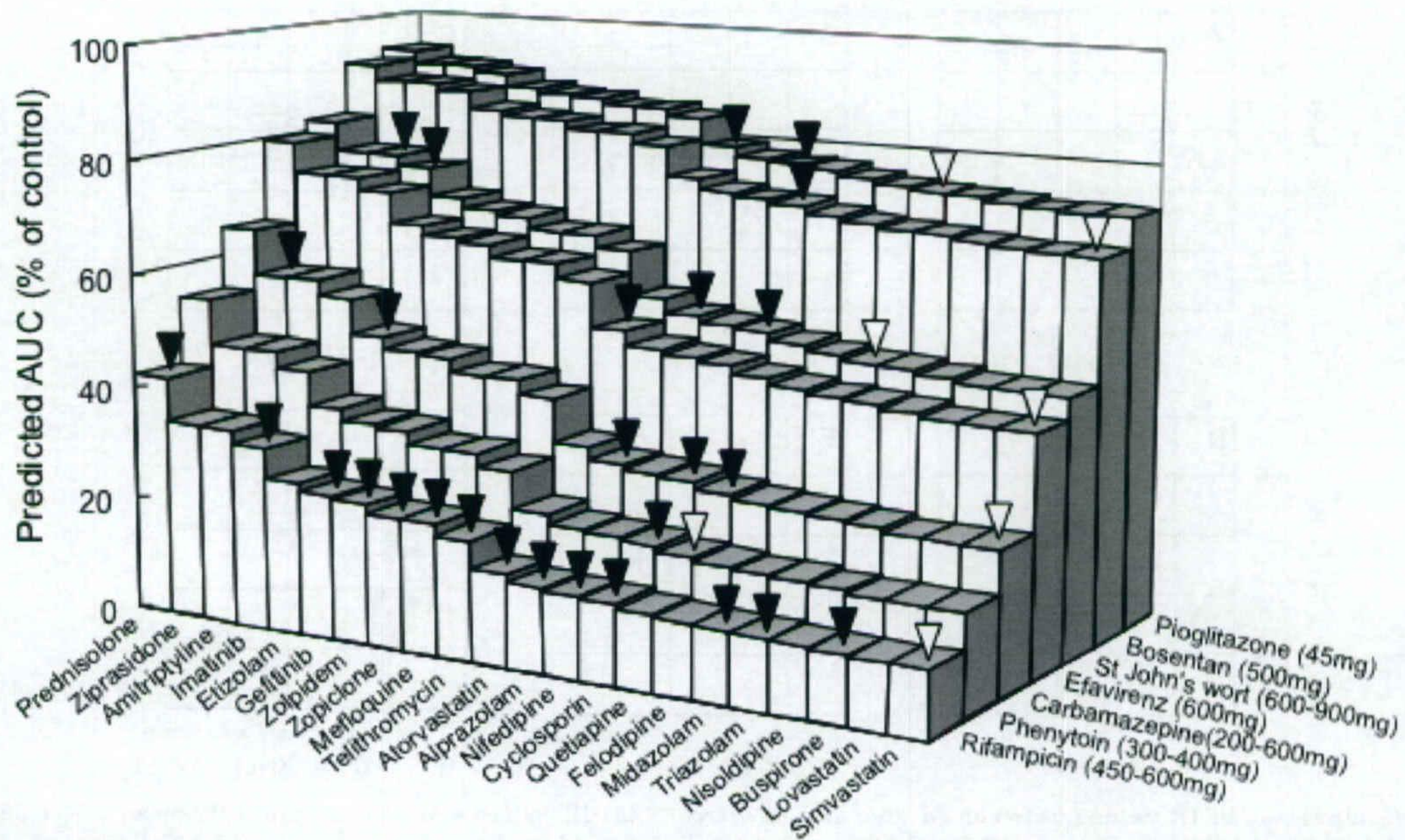


Figure 3. Systematic prediction of AUC reduction by DDIs mediated by induction of CYP3A4. AUC reductions were predicted from CR and IC values using Eq. 10. Bars with open triangles indicate the data used for calculation of IC values, whereas bars with closed triangles indicate the data used for validation. CR values were calculated from the results of observed in inhibitory DDI studies shown in Fig. 2. For all the situations, deviations between predicted and observed AUCs at the steady-state of CYP3A4 induction were less than 20% of the AUCs observed prior to induction. Bars without any symbol indicate combinations for which pharmacokinetic data are unavailable in the literature.

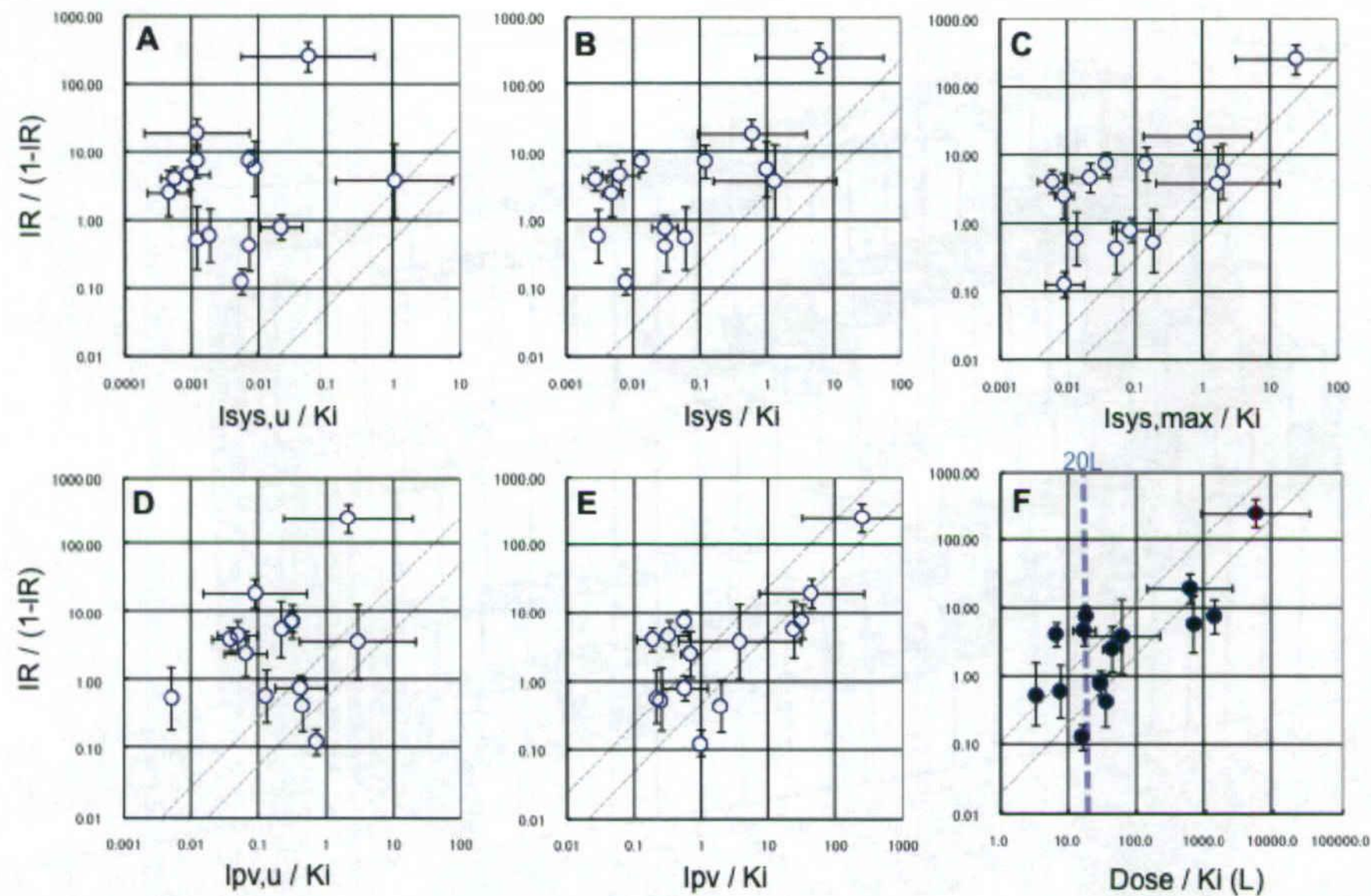


Figure 4. Comparison of IR values between *in vivo* and *in vitro*. $IR/(1-IR)$ values were plotted against the mean unbound concentrations in the systemic circulation divided by K_i ($I_{sys,u} / K_i$; Panel A), mean total (unbound and bound) concentrations in the systemic circulation divided by K_i (I_{sys} / K_i ; Panel B), maximum total concentrations in the systemic circulation divided by K_i ($I_{sys,max} / K_i$; Panel C), unbound concentrations in the portal vein (Eq. 1) divided by K_i ($I_{pv,u} / K_i$; Panel D), and total concentrations in the portal vein divided by K_i (I_{pv} / K_i ; Panel E). In Panel F, K_i values divided by daily dose were used for the analysis instead of I . Dotted lines indicate consistency between *in vitro* and *in vivo* relationships within 50~200% of the precision. The references used in the analysis were those cited in Ito et al. (2004), Brown et al. (2006), (Niwa et al., 2005b), and Galetin et al. (2005).

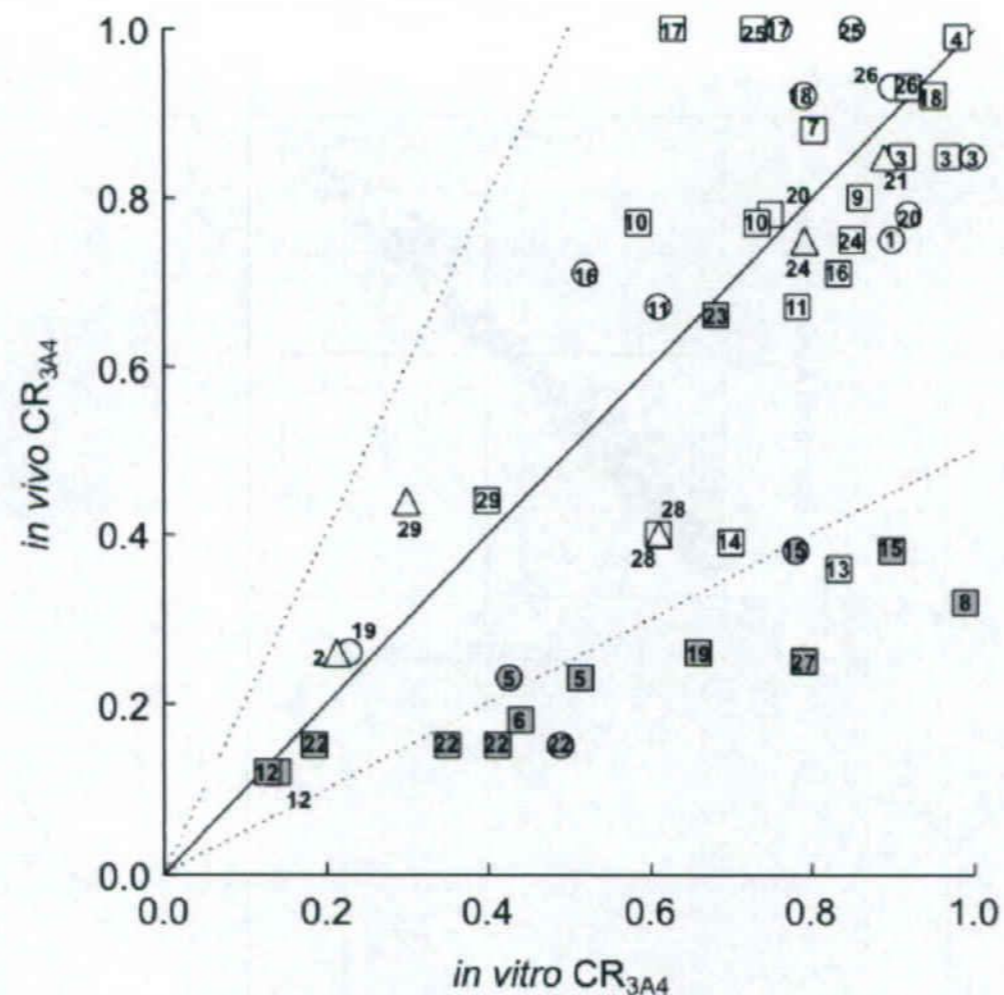


Figure 5. Comparison of CR_{CYP3A4} values between *in vivo* and *in vitro*. *In vitro* CR_{CYP3A4} values were calculated based on information collected from the literature evaluating the metabolizing rate of CYP3A4 in the presence and absence of CYP3A antibody (circles) or typical inhibitors, such as ketoconazole and troleandomycin (squares). Determinations by the relative activity factor (RAF) theory were also included (triangles). *In vivo* CR_{CYP3A4} values were determined as described in the text. Arabic numbers indicate the substrate as follows. 1, alprazolam (Hirota et al., 2001); 2, amitriptyline (Venkatakrisnan et al., 2001); 3, budesonide (Jonsson et al., 1995); 4, buspirone (Zhu et al., 2005); 5, carbamazepine (Kerr et al., 1994); 6, cerivastatin (Boberg et al., 1997); 7, cisapride (Bohets et al., 2000); 8, clarithromycin (Rodrigues et al., 1997); 9, cyclosporin (Omar et al., 1997); 10, dexamethazone (Gentile et al., 1996); 11, domperidone (Simard et al., 2004); 12, efavirenz (Ward et al., 2003); 13, etizolam (Niwa et al., 2005a); 14, gefitinib (McKillop et al., 2005); 15, indinavir (Koudriakova et al., 1998); 16, loratadine (Yumibe et al., 1996); 17, lovastatin (Wang et al., 1991); 18, midazolam (Hamaoka et al., 2001); 19, nevirapine (Erickson et al., 1999); 20, nifedipine (Reilly et al., 1999); 21, quetiapine (Hasselstrom and Linnet, 2006); 22, ritonavir (Kumar et al., 1996; Koudriakova et al., 1998); 23, saquinavir (Eagling et al., 2002); 24, sildenafil (Warrington et al., 2000); 25, simvastatin (Ishigam et al., 2001); 26, triazolam (Kanamitsu et al., 2000a); 27, ziprasidone (Prakash et al., 2000); 28, zolpidem (Pichard et al., 1995; Von Moltke et al., 1999); 29, zopiclone (Becquemont et al., 1999).

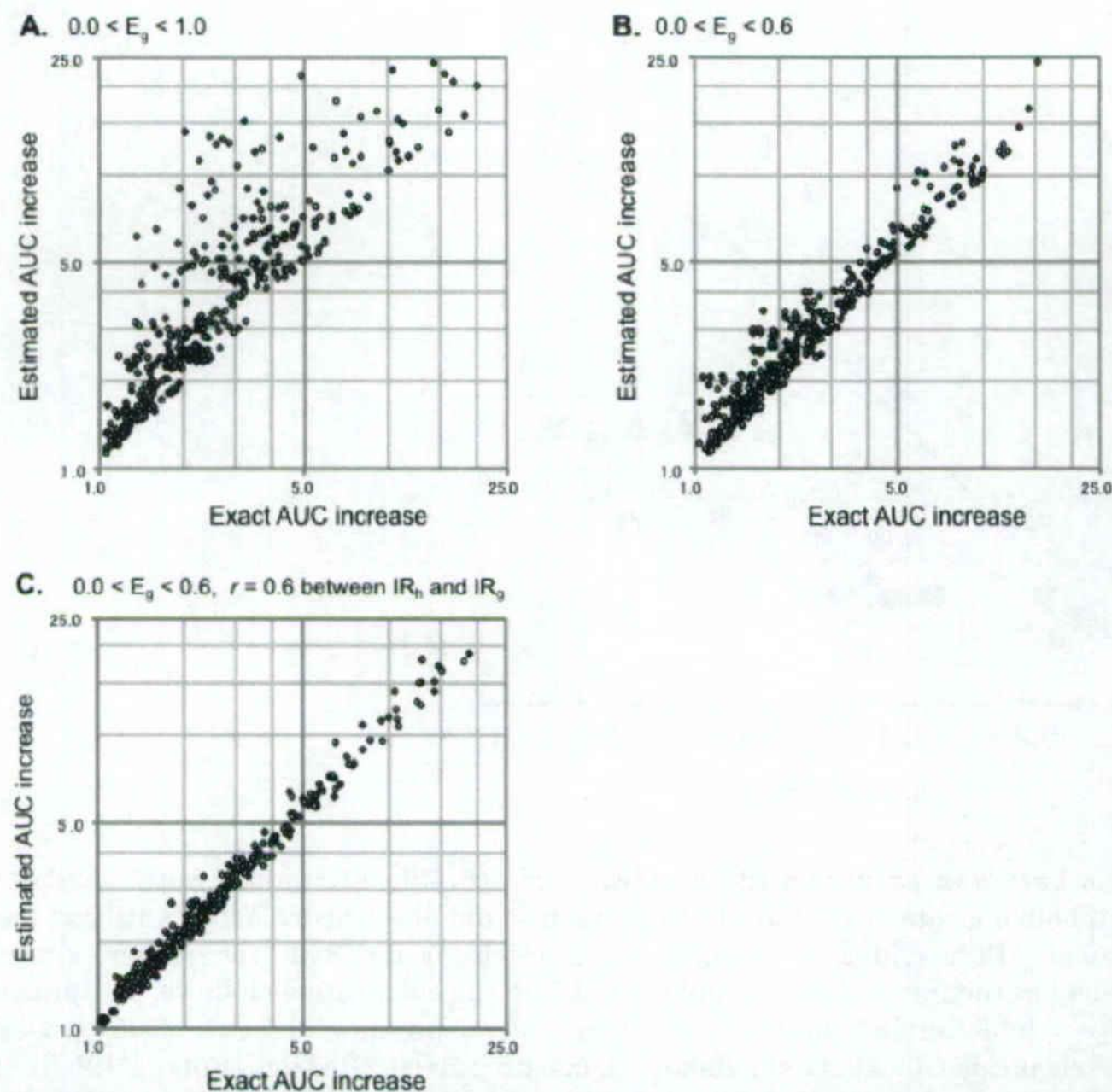


Figure 6. Monte-Carlo simulation of predictability of the AUC increase caused by inhibition of CYP3A4 in the intestine and the liver. AUC increases were simulated in detail considering intestinal and hepatic metabolism using an exact model (Eq. 15) with random parameter values, and the resulting data were analyzed by a simple model which assumes only hepatic metabolism (Eq. 4). In Panel A, values of E_g and E_h were generated randomly and independently between 0 and 1.0 for 3,000 substrate drugs. In Panel B and C, E_g was kept below 0.6 whereas E_h was altered between 0 and 1.0 for substrate drugs. In Panel C, IR_g and IR_h were moderately correlated with a correlation coefficient of 0.6.

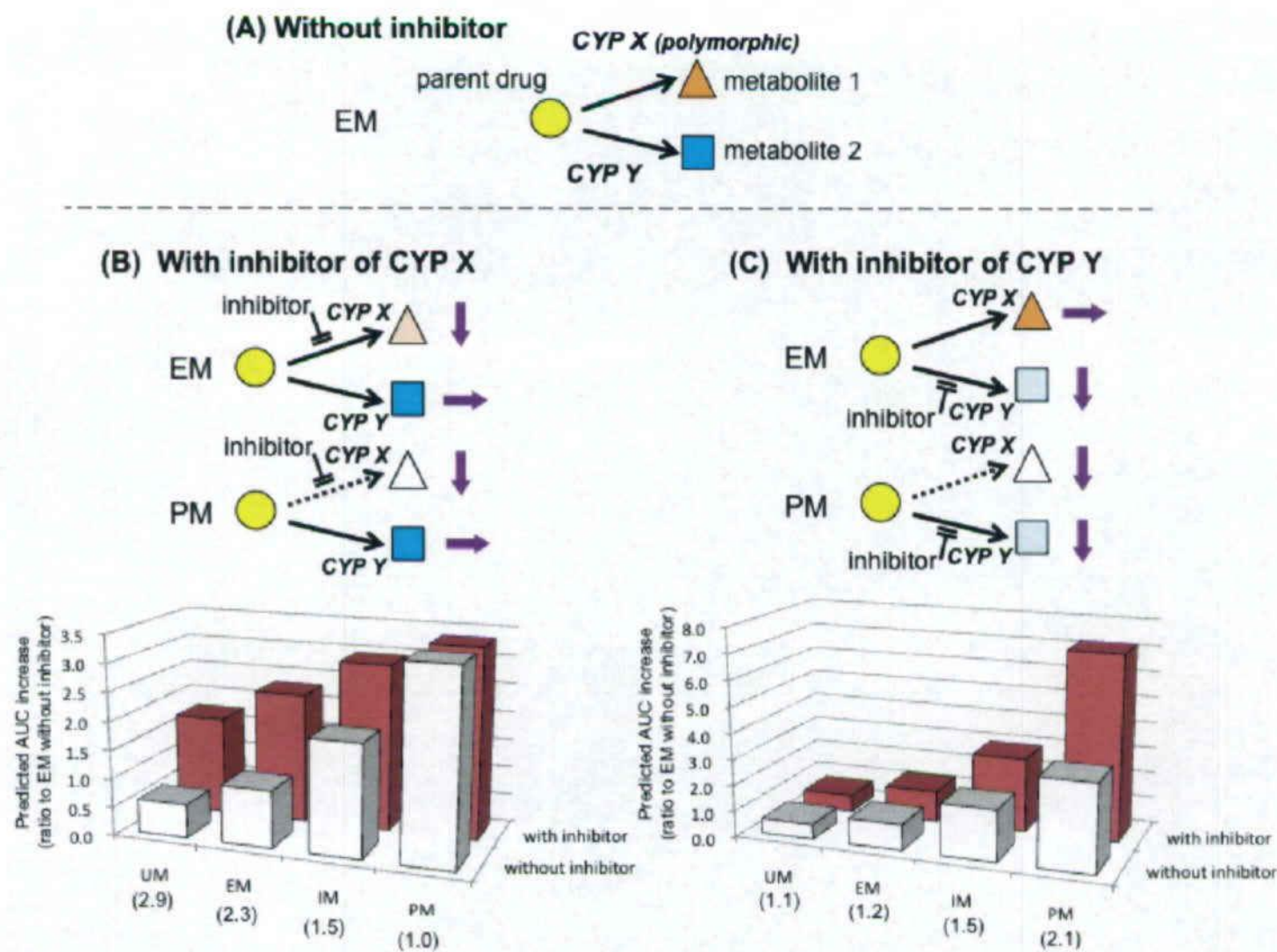


Figure 7. Impact of genetic polymorphisms of CYP on the magnitude of DDIs. AUC increases caused by inhibition of CYP were predicted in the presence and absence of genetic polymorphism of CYP. It was assumed that a model drug is metabolized by CYP X and Y, and CYP X is polymorphic (Panel A). Panels B and C show the results predicted in the presence of an inhibitor of CYP X and CYP Y, respectively. In Panel B, the clearance in PM patients is not affected by an inhibitor of CYP X. In contrast, in Panel C, by an inhibition of CYP Y, the clearance of EM patients remained almost unaltered, whereas that of PM patients was almost abolished and the AUC was dramatically increased. As a typical situation, we used the following kinetic parameters for the calculations with Eqs. 18, 19 and 20: CR of CYP X = 0.2, CR of CYP Y = 0.7, IR of inhibitor = 0.8, $\zeta = -1, 0, 0.7$ and 1 for UM, EM, IM and PM, respectively. The height of the bars represents the ratio of AUC. Numbers in parenthesis are the ratio of AUC in the presence of the inhibitor to that in the absence of the inhibitor for each genetic population

ボリコナゾールおよびフルコナゾールの及ぼす CYP 基質に対する薬物間相互作用の *in vitro* 代謝試験からの予測

久木 隼人¹、樋坂 章博²、鈴木 洋史¹

1. 東京大学医学部附属病院 薬剤部
2. 東京大学医学部附属病院 薬理動態学

序論

近年、血中薬物濃度の高感度定量法の進歩とともに、薬物濃度に基づく臨床薬理学・薬物動態学的検討が多くの薬物について行われてきた。その結果、薬理作用は投与量よりも薬物濃度に強く依存し、血中薬物濃度が治療効果や副作用発現の重要な判断基準になることが明らかにされてきた。また従来、薬理作用・副作用発現の個体差が大きいと考えられてきた薬物の多くが、CYP の遺伝子多型に由来することが明らかになってきた。したがって、薬物治療の有効性・安全性を確保するためには、薬物を適用する患者の遺伝子型に合わせて投与量を個別に最適化することが求められる。

臨床で遺伝子多型が問題となりやすい CYP2C9、CYP2C19 および CYP2D6 のうち CYP2C19 では、本邦では活性欠損型 (PM) が約 20% 近い頻度で存在するため [13-15]、オメプラゾールをはじめとする CYP2C19 基質の治療効果や副作用が問題となる可能性がある。

本研究では、*in vivo* において、強力な CYP3A4 阻害薬である、ケトコナゾール (KCZ) およびイトラコナゾール (ICZ) に匹敵する薬物間相互作用を引き起こすボリコナゾール (VCZ) について、薬物動態および CYP3A4 基質との薬物間相互作用について検証した。VCZ は CYP2C19 も強力に阻害することから、CYP3A4 だけでなく CYP2C19 をも介する併用薬の薬物間相互作用、およびそれに対する遺伝子多型の影響について、より精密な考察が必要と考えられる。

In vivo における薬物間相互作用を *in vitro* における薬物動態パラメータから外挿する方法としては、一般に、CYP に対する K_i 値を用いて以下の式によって求められる。

$$AUC(\text{change}) = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad (\text{Eq. 1})$$

ここで、 I の値としては基質薬物の血漿中タンパク非結合型濃度が広く用いられているが、阻害薬の肝臓中濃度は血漿中濃度と必ずしも等しいとは言えず、VNO のように肝臓中に高度に濃縮される薬物では AUC 上昇率を過小評価してしまう可能性がある。さらに、複数の CYP 分子種による代謝を受ける基質薬物においては、各 CYP の代謝寄与率が考慮されるべきである。そこで、最近、阻害薬の K_i 値は基質に関わらず一定であるとの仮定の下、*in vivo* における薬物間相互作用から算出した CYP3A4 基質の代謝寄与率 (contribution ratio, CR) と、阻害薬の阻害率 (inhibition ratio, IR) を用いることによって、*in vivo* における CYP3A4 基質の薬物間相互作用を (Eq.1) によって予測する試みが報告された [8]。Ohno ら

はこの方法で、*in vivo*における薬物間相互作用から算出したCRを用いて薬物間相互作用を予測しているが、*in vitro*代謝試験から得たCRを用いることで、*in vivo*における薬物間相互作用を簡便かつ網羅的に予測可能となる。

多くの薬物動態を*in vitro*データから予測する研究において、代謝寄与率は一般に f_m (fraction of metabolism) で記述されており、これは肝臓の代謝クリアランス以外が無視できる場合には、経口クリアランスにおける特定の肝固有クリアランス経路の寄与率であるCRと一致する。*In vitro*における f_m あるいはCRの決定法としては、これまで特異的阻害薬や中和抗体を用いたヒト肝ミクロソーム阻害における阻害試験が広く用いられてきた。一方で、この方法では、阻害薬や中和抗体の各CYP分子種への特異性が乏しいことにより、とりわけ寄与の小さいCYP分子種の寄与率を選択的に評価することが難しかった。また、他の分子種による代謝反応を排除しきれず、代謝寄与率を定量的に決定することが困難であった。さらに、代謝物の生成から代謝速度を測定することで代謝寄与率を決定する場合には、代謝物を発見することが前提である上、他の代謝物への代謝を考慮しなければ定量的な固有クリアランスの評価は不可能であった。加えて、治療濃度域の代謝寄与率を評価するためには、代謝反応が線形領域内であることを担保する必要がある、そのために固有クリアランスを基質薬物の K_m よりも十分に低濃度で評価する必要がある。そこで、本研究ではこれらの条件を満足するため、プローブ基質を常に混合した上で、対象基質薬物の固有クリアランスを標準化することで実験の精度および再現性を向上した。また、発現系ミクロソームを用いて基質未変化体の減少から固有クリアランスを算出し、Crespiらが提唱したrelative activity factor (RAF)法を用いてCRを決定した。これにより、阻害剤や中和抗体を用いた代謝試験において問題となる、CYP分子種に対する選択性の問題をも克服した。なお、従来RAF法によって代謝寄与率を決定した報告は多いが、混合したプローブ基質の代謝活性から、基質薬物の固有クリアランスを常に標準化することで実験精度および再現性を向上させた例はない。さらに、LC-MS/MSによる高感度検出によって、基質薬物濃度を極めて低濃度に設定し、代謝反応の線形領域で固有クリアランスを評価した。これまで、これら3点を満たす条件において代謝寄与率を決定する試みの報告例はなく、本研究で確立した新規手法である。本研究では、上記の方法で*in vitro*代謝試験から各種肝代謝型薬物の*in vitro*におけるCRを、網羅的かつ系統的に決定し、*in vivo*における薬物間相互作用を網羅的に予測した。

また本研究においては、本邦において欠損者の多いCYP2C19の遺伝子多型に着目し、上記に加えてCYP2C19遺伝子多型および阻害薬併用時における薬物動態を、*in vitro*代謝試験から網羅的に予測し、前章で薬物間相互作用について焦点を当てたVCZとFCZについて、CYP基質に及ぼす薬物間相互作用について考察した。以下、これらの内容について論述する。

方法

1. 基質薬物の選択

本研究では、CYP3A4 阻害剤の併用および CYP2C19 の遺伝子多型を考慮した薬物間相互作用の予測を行うことを目的としたため、基質としては、肝代謝型薬物であり、かつ CYP3A4 および CYP2C19 による寄与が比較的大きい薬剤（ボルテゾミブ、シロスタゾール、クロミプラミン、エチゾラム、フェロジピン、グリベンクラミド、グリメビリド、ランソプラゾール、ロラタジン、プレドニゾン、プロプラノロールおよびセルトラリン）を選択した。また、トルブタミド（CYP2C9）、オメプラゾール（CYP2C19）、イミプラミン（CYP2D6）およびミダゾラム（CYP3A4）のように、各 CYP 分子種の寄与が大きいことが報告されている薬物も含め、16 剤とした。

2. ミクロソーム代謝試験

リン酸塩緩衝液（pH = 7.4）（終濃度 0.1 M）、EDTA（終濃度 0.1 mM）、各種バキュロウイルス発現系ミクロソームあるいは HLM、基質、ヒト血清アルブミン（終濃度 0.1%）を 1.5 mL プラスチックチューブに加え、37°C に温めたインキュベータ（水浴）で 5 分間ブレインキュベーションしたのち、予め混合しておいた NADPH 産生ミックス溶液 [NADP⁺（終濃度 0.5 mM）、glucose 6-phosphate（終濃度 2 mM）、MgCl₂（終濃度 4 mM）、glucose 6-phosphate dehydrogenase（終濃度 1 unit/mL）] を加えることで反応を開始した。全ての試験を加えた後の液量は、40 μ L で行った（各基質の反応液中濃度、ミクロソーム濃度、阻害薬濃度、インキュベーション時間については付録 Table 6, 7, 8 を参照）。基質薬物は、最大 8 化合物を混合し、各薬物濃度を 50 nM とした。また、インキュベーション反応液は、有機溶媒濃度が 1% 以下となるように調整した。

所定時間反応させた後、120 μ L の内部標準物質（internal standard, IS）溶液（0.1 μ M metoprolol Methanol 溶液）を添加することにより反応を停止させ、15,000 G で 10 分間、4 °C で遠心分離したのち上清を採取し、LC-MS/MS によって薬物濃度、および代謝物濃度を測定した。実験は n = 3 で行った。各基質及び代謝物測定の LC-MS/MS の定量法は、付録 Table 1, 2, 3 および 4 にまとめた。

3. HLM および発現系ミクロソームにおけるプローブ化合物の固有クリアランスの算出

ミクロソーム代謝試験に記載した方法に準じ、プローブ基質薬物としてはフェナセチン（1A2）、ブプロピオン（2B6）、バクリタキセル（2C8）、トルブタミド（2C9）、オメプラゾール（2C19）、デキストロメトर्फファン（2D6）およびテストステロン（3A4）を選択した。反応液中にはこれらプローブ化合物が 50 nM となるように混合し、所定時間反応させた後、氷冷した IS 溶液を添加することにより反応を停止した。インキュベーション時間依存的な基質未変化体の減少速度から、薬物の固有クリアランスを算出した。HLM は 3 ロット用意し、それぞれの代謝試験から得られた固有クリアランスの平均を、ヒト肝におけるプローブ化合物の固有クリアランスとし、RAF 算出に用いた。インキュベーション条件を、付録 Table 6 および 7 にまとめた。

4. 基質薬物の固有クリアランスの算出

基質薬物の固有クリアランスは、バキュロウイルス発現系ミクロソームを用いて、イン

キュベーション時間依存的な基質未変化体の減少速度から、薬物の固有クリアランスを算出した。インキュベーション時間、及びマイクロソーム濃度は付録 Table 8 に示した。

5. RAF 法による代謝寄与率の決定

RAF は、ある分子種に特異的な代謝反応の発現系における活性とヒト肝マイクロソームにおける活性の比である。それぞれの基質濃度は 50 nM とし、プローブ化合物を含め、8 つの薬物を混合し同時にインキュベーションした。各代謝酵素の RAF は以下の式より算出した。プローブ基質の固有クリアランスを $CL_{int,p}$ とすると、

$$RAF_n = (CL_{int, HLM,p} \text{ of CYP}_n) / (CL_{int, rec,p} \text{ of CYP}_n) \quad (\text{Eq. 2})$$

$$n = 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 \text{ or } 3A4$$

HLM における基質薬物の分子種ごとの固有クリアランス ($CL_{int,s}$) は、RAF を用いて、

$$CL_{int, HLM,s} \text{ of CYP}_n = RAF_n \times (CL_{int, rec,s} \text{ of CYP}_n) \quad (\text{Eq. 3})$$

とあらわされる。したがって、肝固有クリアランスは、

$$CL_{int, HLM,s} = \Sigma[RAF_n \times (CL_{int, rec,s} \text{ of CYP}_n)] \quad (\text{Eq. 4})$$

となる。したがって、各代謝酵素の代謝寄与率は

$$CR = (CL_{int, HLM,s} \text{ of CYP}_n) / (CL_{int, HLM,s})$$

$$CR = RAF_n \times (CL_{int, rec,s} \text{ of CYP}_n) / \Sigma[RAF_n \times (CL_{int, rec,s} \text{ of CYP}_n)] \quad (\text{Eq. 5})$$

から求められる。

6. VCZ および VNO のヒト血漿中濃度の測定

東京大学医学部付属病院（以下、本院とする）において VCZ を投与されている 9 名（年齢 22~73 歳）の患者について、本院倫理委員会の承認のもと、VCZ および VNO の血漿中濃度を LC-MS/MS にて測定した。LC-MS/MS 分析には、Waters の UPLC (sample manager, binary solvent manager) および MS 検出器 (Quattro Premier) を用いた。メインカラムには Waters の Acquity UPLC® BEH C18 1.7 μm 2.1 \times 100 mm Column を、プレカラムには Van Guard™ BEH C18 1.7 μm を Waters から購入した。VCZ および VNO の分析条件は、付録 Table 1 および 4 に示す。

結果

1. RAF の算出

HLM および発現系マイクロソームにおける、各 CYP 分子種のプローブ基質の固有クリアランスを算出し、その比をとることで RAF を算出した。HLM および発現系マイクロソームにおけるプローブ化合物の固有クリアランスと RAF を Table 11 に示す。HLM におけるプローブ基質の固有クリアランスは、3 ロットの HLM を用いた代謝試験から算出した固有クリアランスの平均値を用いた。

2. 代謝寄与率の算出

In vivo における薬物間相互作用を *in vitro* から予測するために、各 CYP 分子種の発現系マイクロソームを用いて、代謝寄与率を算出した。各 CYP 分子種のプローブ化合物の固有クリアランスを、HLM および発現系マイクロソームを用いて算出し、relative activity factor (RAF) 法によって 16 薬剤の各 CYP 分子の代謝寄与率を求めた。*In vitro* 代謝試験から得られた代謝寄与率の一覧を Table 12 に示した。

3. *In vitro* 代謝試験から算出した代謝寄与率の *in vitro* 報告値との比較

本研究において求められた *in vitro* 代謝寄与率の妥当性を検証するために、*in vitro* 報告値と比較した (Table 13, Fig. 12)。本研究にて選択した基質薬物の中で、*in vitro* 代謝試験における代謝寄与率の検討が報告されている、イミプラミン[44, 45]、プロプラノロール[44, 45]、セルトラリン[46]、ボルテゾミブ[47]、オメプラゾールおよびランソプラゾール[48] について、分子種ごとに代謝寄与率を比較した (Table 13, Fig. 12)。その結果、本研究で求められた代謝寄与率と報告値は、 $\pm 20\%$ の範囲内で概ね一致した。

4. *In vitro* 代謝試験から算出した代謝寄与率の *in vivo* 代謝寄与率との比較

バキュロウイルス発現系マイクロソームを用いた代謝試験から算出した代謝寄与率を、*in vivo* における代謝寄与率と比較した (Table 14)。*In vivo* において代謝寄与率が求められている基質薬物はごく限られるが、CYP2C9 の基質薬物であるトルブタミド、グリメピリドは本研究において求められた *in vitro* 代謝寄与率と、*in vivo* 報告値がほぼ一致した。また、CYP2C19 についてはオメプラゾールおよびランソプラゾール、CYP2D6 についてはイミプラミン、プロプラノロール、CYP3A4 ではミダゾラム、シロスタゾールおよびフェロジピンについても *in vivo* における報告値と 20% 以内の範囲で一致した[8]。一方で、これら以外の多くの薬剤について、*in vivo* における代謝寄与率が決定されていないため、さらなる検証が必要であると考えられる。

5. *In vitro* における代謝寄与率に基づく *in vivo* における薬物間相互作用の予測

In vitro 代謝試験から算出した代謝寄与率と、*in vivo* における VCZ と FCZ の CYP3A4 および CYP2C19 に対する阻害率を用いて、*in vivo* で想定される薬物間相互作用を予測した。VCZ および FCZ の CYP3A4 および CYP2C19 の阻害率は、ミダゾラムおよびオメプラゾールの AUC 上昇率の報告値を用いて、

$$AUC(\text{change}) = \frac{1}{1 - CR_{CYP1} \times IR_{CYP1} - CR_{CYP2} \times IR_{CYP2}} \quad (\text{Eq. 6})$$