

令和元年6月5日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08428

研究課題名(和文) 唾液中nicotine代謝物を用いた薬物代謝活性の簡便な推定法による禁煙治療設計

研究課題名(英文) Appropriate administration of nicotine according to the metabolic enzyme activity estimated from the nicotine metabolites in saliva.

研究代表者

田山 剛崇 (Tayama, yoshitaka)

広島国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：80389121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：1. Nicotineとその代謝物を半定量できる測定システムの開発を試みた。紫外線照射前後の吸光度変化を用いたシステムにより各化合物とも10 µg/mLまで半定量が行えた。2. A0活性の異なる2系統のラットとCYP2A6阻害剤を用いて、cotinine体内動態に及ぼす各酵素の影響を検討した。CYP2A6阻害モデルにおいて血清cotinine濃度が低値を、低A0活性ラットにおいても低値を示した。CYP2A6非阻害の高A0ラットにおいてcotinineがいずれのラットよりも高値を示した。Nicotine代謝にはA0活性の関与も大きく、A0活性の個人差を考慮したニコチン製剤の投与が必要と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

禁煙に向けた取り組みとして、禁煙補助薬のニコチン製剤が使用される。この主成分であるnicotineは、cytochrome P-450 2A6 およびaldehyde oxidaseにより代謝される。これら酵素活性には、大きな個体差が存在している。従って、これら酵素の活性を指標としたニコチン製剤の投与設計が望まれる。しかし、これらの酵素活性を推定する機器は、特別な機関に設置してあるのみで、ニコチン製剤を販売している薬局にはない。いずれの施設においてもnicotine代謝酵素活性を測定できる方法を作るとともに、推定した代謝酵素活性より、ニコチン製剤の投与設計を行う簡便な方法をつくりたい。

研究成果の概要(英文)：1. Semi-quantify system of the concentration of nicotine and their metabolites. We tried to develop a measurement system, it can semi-quantify the concentration of nicotine and the metabolites. Our analysis system was able to be performed up to 10 µg/mL for these compounds by using UV irradiation. 2. The contribution of metabolic enzyme, CYP2A6 and A0, on cotinine pharmacokinetics. We used two strains rats with different A0 activities and CYP2A6 inhibitors, methoxalene. In inhibition of CYP2A6 activity, it was shown the lower cotinine in serum than no inhibition of CYP2A6. And, low A0 rats showed lower cotinine concentration in serum than high A0 activity rats. High A0 rats with no treatment with methoxalene, (High A0, no inhibition CYP2A6) showed highest concentration of cotinine in serum among all groups. Not only CYP2A6 but also A0 affected on cotinine pharmacokinetics largely. In administration of nicotine, it is necessary to take account for the estimated CYP2A6 and A0 activity.

研究分野：医療薬学

キーワード：nicotine製剤 投与設計

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、喫煙と慢性閉鎖性肺疾患(COPD)など重篤な疾病との関連性が報告され、禁煙に向けた取り組みがなされている。2006年より、禁煙治療が健康保険適応となり、禁煙を希望する喫煙者に対し、禁煙補助薬であるニコチン製剤を投与するが増加している。ニコチン製剤の投与設計は、患者の喫煙本数(プリンクマン指数)によって決定される。しかし、禁煙の意思があるにもかかわらず、不安やイライラなどの症状により、その治療を中止する場合がある。これら禁断症状の要因として、たばこ中に含有される nicotine やその代謝物 cotinine の関与が知られている nicotine は、Cytochrome P-450 2A6 (CYP2A6)によって 5'-hydroxynicotine に代謝され、さらに、aldehyde oxidase (AO)によって cotinine へ代謝される。その後、再び CYP2A6 により、3'-hydroxycotinine に代謝されることが知られている。これら酵素活性には、大きな個体差が存在している。従って、これら代謝酵素活性を指標としたニコチン製剤の投与設計が望まれる。

2. 研究の目的

Nicotine の代謝能活性を推定する方法として、生体内の nicotine 代謝物濃度を測定する必要がある。しかし、これまで報告されている nicotine 濃度測定は多くは LC-MS 等を使用した方法である。これら機器は、特別な機関に設置してあるのみで、クリニックやニコチン製剤を販売している薬局にはない。本研究では、ニコチン製剤を販売している薬局でも簡便に nicotine 濃度評価を行える手段を開発し、その濃度比より nicotine 代謝酵素活性を推定することでニコチン製剤の適正使用を推進することを目標としている。

3. 研究の方法

(1) Nicotine 濃度評価方法の確立

() TLC (thin-layer chromatography) を用いて nicotine とその代謝物(cotinine, 3'-hydroxynicotine) の分離をおこなった。溶媒は市中の薬局でも行えるように水道水およびエタノールを用いた(エタノール:水道水=1:9)。TLC は分取用シリカゲルプレートを用いた。

一次元展開にて、nicotine とその代謝物を分離後、バルビツール酸を染み込ませた濾紙を、TLC の上側部分に密着させた状態で、二次元展開を行い、一次元展開で分離された nicotine 代謝物が、展開溶媒に含有される塩化シアンと開裂反応し、グルタコンアルデヒド誘導体が合成される。このグルタコンアルデヒド誘導体が、濾紙に染み込ませてあるバルビツール酸と反応し、赤色を呈する。この赤色の濃度を 3 色分解デジタルカメラの解析により、nicotine とその代謝物を半定量できる測定システムの開発を試みた(Figure 1)。

() 上記と同様の方法にて、唾液サンプルおよび標品をスポット後、一次元展開した。その後、365 nm の紫外線を照射しながら、デジタルカメラで撮影を行った。次に、254nm の波長を 15 分照射し、再び 365 nm の紫外線照射下において撮影を行った。デジタルカメラで撮影した 2 枚の画像の変化度より、nicotine およびその代謝物を推定した。

(2) AO 活性および CYP2A6 活性が nicotine 代謝に及ぼす影響

高 AO 活性を示す jcl:SD 雄性ラットおよび低 AO 活性を示す Crlj:CD 雄性ラットを用いた。CYP2A6 選択的阻害剤である methoxsalen をラットに経口投与後、nicotine を尾静脈投与した。その後、経時的に血中 cotinine 濃度を

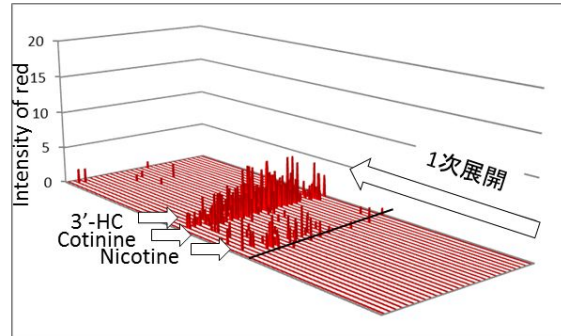


Figure 1
グルタコンアルデヒド誘導体を用いた
Nicotine 代謝物の簡便な推定方法
グルタコンアルデヒド誘導体とバルビツール酸の反応により生じた赤色の強度

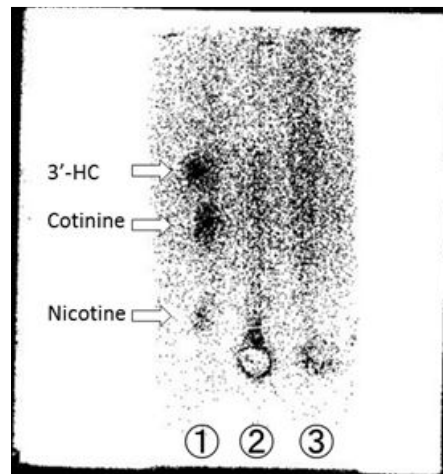


Figure 2
Nicotine 代謝物の簡便な推定方法
標品 喫煙者(80 μL) 喫煙者(80 μL), 3'-HC: 3'-hydrocotinine 照射前後の変化部分は黒色にて示す。

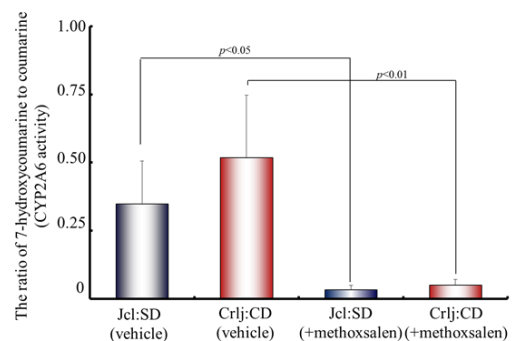


Figure 3
CYP2A6 活性に及ぼす methoxsalen の影響
methoxsalen 投与により CYP2A6 活性の低下が認められた。

(n=3)

測定した。なお、in vivo AO 活性は生体内物質 nicotinamide 代謝物とその酸化体の尿中比(RP 値：ratio of pyridone)より、in vivo CYP2A6 活性は経口投与した coumarine とその酸化体の尿中比より推定した。

4. 研究成果

(1) 当初、我々は二次元展開 TLC 法を用いて nicotine 代謝物の半定量を試みた。すなわち、しかし、スパイク唾液を用いたサンプルにおいて半定量を行うことができたものの、通常の濃度において、これら呈色反応が不十分な検体もあり、評価のバラツキが認められた(研究の方法 1())。そのため、半定量をより精度よく行うことを目的とし、254 nm の紫外線照射前後の 365 nm の波長吸収度変化によりこれらの濃度を推定した。各化合物とも 10 µg/mL 濃度まで半定量が行えた。また、ヒト喫煙者の唾液を用いた検討においても、喫煙直後と限定的であるが、nicotine およびその代謝物の存在が確認できた(Figure 2) (研究の方法 1())。

(2) 次に、AO 活性および CYP2A6 活性の影響を明らかにする目的で、AO 活性の異なる 2 系統のラットを用いて、cotinine 体内動態に及ぼす AO 活性の影響を検討した。高 AO 活性を示す jcl:SD ラットおよび低 AO 活性を示す Crlj:CD ラットを用いた。CYP2A6 選択的阻害剤である methoxsalen をラットに経口投与後、nicotine を尾静脈投与した。その後、経時的に血中 cotinine 濃度をした。両系統ラットにおいて、methoxsalen 前投与により CYP2A6 活性は同程度の活性まで低下した(Figure 3)。一方、AO 活性は 3 倍もの系統差を観察した(Figure 4)。CYP2A6 活性阻害モデルにおいて、血清 cotinine 濃度が低値傾向を示した(methoxsalen 処理/methoxsalen 非処理の AUC 比:jcl ラット 1/3 Crj ラット 1/7 倍)。methoxsalen にて CYP2A6 活性を阻害し AO 活性が異なるラットにおいて、血清 cotinine 濃度が異なることを示した(Crj ラット/jcl ラットの AUC 比:1/17)。また、methoxsalen 非処理の jcl:SD ラットにおいていずれのラットよりも cotinine の AUC が高値を示した(Figure 5)。Nicotine 代謝には AO 活性の関与も大きく、AO 活性の個人差を考慮したニコチン製剤の投与が必要と考える。

(3) まとめ 高濃度域における nicotine およびその代謝物濃度の簡便な評価方法は確立したものの、臨床濃度における評価方法はさらなる改善が必要かもしれない。今後、より感度を上げ臨床濃度域の評価方法を考案したい。また、nicotine 代謝において CYP2A6 および AO 活性が大きく関与することが明らかとなった。AO の個体間差は約 4 倍ともいわれており、ニコチン製剤の投与設計を行う上で、CYP2A6 および AO 活性を考慮することは重要であることが示された。今後臨床に応用できるように展開していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

高杉 俊行, 山下 将司, 田山 剛崇, 花野 藍, 西村 さとみ, 前田 志津子, 覚前 美希, 三宅 勝志 cAMP 活性作用を有する医薬品が薬物代謝酵素に及ぼす影響 第 27 回 日本医療薬学会 (2017)

田山剛崇, 西村さとみ, 前田志津子, 杉原数美, 北村繁幸, 佐和章弘, 三宅勝志 Nicotine 代謝に及ぼす aldehyde oxidase および CYP2A6 の影響 第 28 回日本医療薬学会年会(2018)

田山剛崇, 西村さとみ, 杉原数美, 北村繁幸, 佐和章弘, 三宅勝志 Aldehyde oxidase および

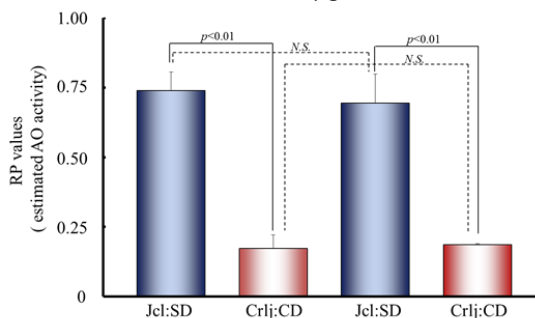


Figure 4
AO 活性に及ぼすラット系統差および methoxsalen の影響
methoxsalen 投与は AO 活性に影響を及ぼさなかったが 3 倍もの系統差を観察した。

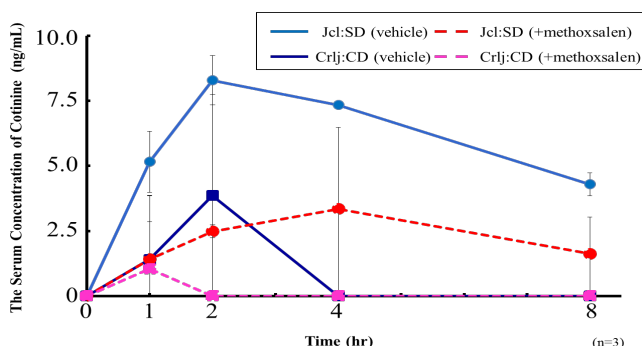


Figure 5
Nicotine 投与における血清中 cotinine 濃度推移

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：杉原 数美

ローマ字氏名：SUGIHARA kazumi

所属研究機関名：広島国際大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：20271067

研究分担者氏名：北村 繁幸

ローマ字氏名：KITAMURA shigeyuki

所属研究機関名：日本薬科大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：40136057

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。