

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006 ～ 2009

課題番号：18590542

研究課題名 (和文) 尿中ステロイド代謝体の LC-MS 分析による薬物代謝酵素分子種活性検査法の開発

研究課題名 (英文) Studies on the urinary assay of CYP-mediated endogenous corticosteroid metabolites with a LC-MS method

研究代表者 越前 宏俊 (ECHIZEN HIROTOSHI)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00191924

研究成果の概要 (和文) : 近年、薬物応答性の個人差には薬物の体内動態に関わる薬物代謝酵素、トランスポーターの遺伝多型が関係することが判明し、ゲノム情報に基づく薬物治療の個別化が推進されて来た。しかし、既知の薬物動態関連分子遺伝子の SNP に差異がなくても薬物動態関連分子の機能には大きな個人差があることも判明してきた。その原因については代謝酵素の基礎発現量に関わる環境あるいは発現調節機構の応答分子の遺伝変異の存在が注目されているが、未だにその本態は不明である。このため、再び個別患者における代謝活性表現型評価法の必要性が注目されている。研究代表者は、内因性副腎皮質コルチゾール分子の 6 β 位水酸化反応が CYP3A4 分子種により行われることに注目し、コルチゾールから 6 β 水酸化への部分代謝クリアランスを評価する方法を開発し、正常人、肝硬変患者および CYP3A4 阻害薬による薬物代謝酵素活性の評価法を確立した。内因性のステロイドは副腎皮質ステロイドだけでなく、多くの性ステロイドがあり、その部位特異的な代謝に異なる CYP 分子が関係している。従って、ステロイドホルモンの部位特異的な代謝物の尿中測定により CYP3A4 以外の CYP 分子種の活性の個人差を評価できる可能性がある。これまでに、CYP2C19 が代謝に関連すると考えられるプロゲステロンの 2 位水酸化体とテストステロンの 17 位水酸化体測定法と、CYP1A2 が関係すると考えられるエストラジオールの 2-,4-,および 16 α 位の水酸化体の HPLC-UV 法尿中測定法を確立し、これらの酵素活性の個人差について予備的な検討を行い、大きな個人差があることを明らかにした。更に、感度と特異性に勝る LC-MS にて検討し測定法はほぼ確立した。今後は、本研究で確立された方法論をより大きな健常人集団に対して、酵素活性の個人差と既知の SNP 情報との対応と取る臨床試験に発展させる予定である。

研究成果の概要 (英文) : Interindividual variability of the drug metabolizing enzyme activity is associated with those of drug responses and adverse drug reactions. Recent advances in molecular biology have made it possible to account for a part of interindividual variability of important drug metabolizing enzymes, particularly cytochrome P-450s (CYPs) in the light of pharmacogenomics. Nevertheless, it has also become evident that a large interindividual variability still exists in subjects or patients having none of the previously known loss-of-function SNPs in the respective CYP isoforms. Thus, there is a surge of

interest to reappraise for assessing CYP isoform activity as phenotype individually. We have previously reported that *in vivo* CYP3A4 activity may be assessed by urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol, a CYP3A4 metabolite of adrenal cortisol, or its metabolic ratio of cortisol. In order to extend this idea to other steroid hormones which are thought to be metabolized by different CYP isoforms, we aimed to establish a comprehensive assay method using HPLC-UV and LC-MS. We have established a simultaneous assay method for urinary 2- and 4-hydroxyestradiol and 17-hydroxyprogesterone, of which metabolism are associated with CYP1A2 and CYP2C19, respectively, with an HPLC-UV method as a preliminary study. We found that there is a large interindividual variability in the urinary excretion of those sex steroid metabolites, indicating that there is a good chance to measure interindividual variability of the these CYP activities. Then, we advanced our study to establish a LC-MS method. We consider that this method would be useful for a population study where a large number of clinical samples are to be assayed.

交付決定額

(金額単位：円)			
	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	660,000	4,360,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：薬物代謝、個人差、ステロイドホルモン

1. 研究開始当初の背景

近年、薬物応答性の個人差には薬物の体内動態に関わる薬物代謝酵素、トランスポーターの遺伝多型が関係することが判明し、ゲノム情報に基づく薬物治療の個別化が推進された。しかし、その成果から現時点でのゲノム情報では説明できない薬物代謝や応答性の個人差の存在も明かとなり、再び個別患者における代謝活性表現型評価法の必要性が注目されていた。本研究では、ヒトで普遍的に存在する性ステロイドホルモンの部位特異的な水酸化反応がいくつかの CYP 分子種活性に関係しているとの *in vitro* データをもとに、尿中性ステロイドホルモンの特異的な代謝体を測定することにより *in vivo* の CYP 活性を評価することを目指したものである。

2. 研究の目的

現時点ではゲノム情報に基づく CYP 活性の予測は、非遺伝的要因（環境因子など）による影響が大きいため正確な投与量予測に結び付けられない限界がある。そこで、再び非侵襲的に比較的容易に採取可能な尿試料を用いた全身 CYP 活性の評価法を確立することを目的として。その際、検出の特異性が高いため内因性物質の測定に威力を発揮する LC-MS 法の応用を試みた。

3. 研究の方法

健常人尿試料を用いて、尿中 2 位および 4 位のエストラジオール水酸化体と 17 位水酸化プロゲステロンの測定法確立を行った。第 1 段階としては、逆相 HPLC-UV 法により、個々の代謝体の尿中試料からの抽出、分離、検出を確立した。特に、実用化の観点から可

能な限り同一の抽出方法で、測定も自動化が容易な isocratic 条件下での測定法を目指した。その結果、基本的には従来 6β 水酸化コルチゾール測定法で確立した条件で十分な抽出率が得られることが判明し、方法は確立された。次いで、30 検体程度の健常人尿試料を用いて尿中クレアチニン濃度で補正した上記 3 代謝体の排泄量測定を行ったところ大きな個人差が認められ、多峰性分布を示唆する所見も得られた。今後は多数のサンプルを収集する臨床試験を計画し、測定方法も LC-MS 法に移行して研究をまとめつつある。

4. 研究成果

健常人尿試料を用いた結果では、尿中 2 位および 4 位のエストラジオール水酸化体と 17 位水酸化プロゲステロン代謝体は C₁₈ の逆相カラム (CapcelPak, Shiseido) で保持時間 15, 17, 40 分で同時定量可能であった。但し HPLC-UV 法を用いる限りにおいて、前 2 者と後者の UV 吸収特性が異なるため、測定波長をそれぞれ 210nm と 245nm に切り替える必要があった。分離はアセトニトリル 20% が最適であった。抽出は妨害ピークの多寡の観点から酢酸エチルが最適であった。但し、上記のステロイド代謝体の尿中濃度は低く (10-100ng/mL)、しばしば妨害ピークが問題となり、その除去に多大な時間を必要とした。予備的検討として、健常人尿試料 30 検体を測定したが、個々のステロイド代謝体の尿中濃度には大きな個人差があった。LC-MS 法では妨害ピークの問題は回避され、より実用的な方法であると考えられた。本方法を用いれば、基礎状態のヒト CYP 分子種評価と薬物相互作用の検出にも応用が可能となるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Takahashi, H, Wilkinson, GR, Nutescu, EA, Morita, T, Ritchie, M, Scordo, MG, Pengo, V, Barban, M, Padriani, R, Ieiri I, Otsubo, K, Kashima T, Kimura S, Kijima S, Echizen H, Different contributions of polymorphisms in *VKORC1* and *CYP2C9* to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African Americans.. *Pharmacogenetics & Genomics*, 16:101-110, 2006.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 柴田壮一、高橋晴美、小野紀子、和田直子、久保博昭、篠崎公一、齋藤京、稲本伸子、越前宏俊、厚田幸一郎白癬患者に対するイトラコナゾールパルス療法施行時の CYP3A 活性の経時的変化、日本臨床薬理学会第 30 回年会、2009/11、横浜。

[図書] (計 1 件)

- ① 越前宏俊、医学評論社、医療薬物代謝学、2010 年、104-116 頁。

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 越前 宏俊
(HIROTOSHI ECHIZEN)

研究者番号：00191924

(2) 研究分担者 大西 明弘
(AKIHIRO OHNISHI)

研究者番号：00194225

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：