

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14991

研究課題名（和文）個別化医療を目指した13C-リドカイン呼気試験による薬物代謝能評価系の検討

研究課題名（英文）Development of a novel 13C-lidocaine breath test for evaluating cytochrome P450 metabolic activity oriented to personalized drug therapy.

研究代表者

杉山 恵理花 (Sugiyama, Erika)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：50302732

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,000,000円

研究成果の概要（和文）：個別化医療に繋がる迅速簡便な薬物代謝酵素シトクロムP450(CYP)活性の定量的評価法の開発を目的とし、13C-リドカインを用いた新たな呼気試験法の検討を行った。薬物代謝活性を変動させたマウスを用いた呼気試験および体内動態検討により、13C-リドカイン経口投与時の呼気反応は初回通過効果におけるCYP3A代謝活性を反映することが示唆され、生理学的動態（PBPK）モデル解析においても示された。さらに、その呼気反応パラメータと従来法であるミダゾラム動態パラメータには正の相関性が認められた。以上より、13C-リドカイン呼気試験法を用いてCYP3A代謝変動を迅速簡便に定量的に評価できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、13C-リドカイン経口投与呼気試験を用いて、非侵襲的かつ迅速簡便に、その時点での患者の薬物代謝能を定量的に評価できる可能性が示された。この新たな呼気試験法が確立されれば、臨床現場において非侵襲的かつ迅速簡便に患者個々の薬物代謝能を評価することが可能となり、その時点での患者の状態に応じた薬物選択や投与量調節の支援に役立ち、適正な個別化薬物療法に大きく貢献できると考えられる。本研究成果は、その基礎データの構築と従来の評価方法との比較検討を行い、本評価法の確立に重要な情報を構築できたと考える。

研究成果の概要（英文）：A novel breath test using 13C-lidocaine was evaluated for developing a rapid and convenient quantitative evaluation method for assessing individual cytochrome P450 (CYP) metabolic activity for use in personalized drug therapy.

Results of breath tests and pharmacokinetic studies in mice with altered drug metabolic activity suggested that the breath test response after oral administration of 13C-lidocaine reflected CYP3A metabolic activity in the first-pass effect. This is consistent with the results of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model analysis. Furthermore, a positive correlation was observed between the respiratory response parameters and midazolam kinetic parameters (a conventional evaluation method of CYP3A activity). This study demonstrates that the 13C-lidocaine breath test provides a rapid and easy quantitative evaluation of changes in CYP3A metabolic activity.

研究分野：薬物動態学、臨床薬物動態学、臨床薬学

キーワード：13C-呼気試験 13C-リドカイン CYP3A 薬物代謝評価

1. 研究開始当初の背景

薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP)は、多くの薬物の代謝に関与しており、その変動は臨床問題となることが多い。薬物代謝能の変動は、当該薬物の体内動態を変化させて効果や有害事象発現に影響を及ぼすだけではなく、薬物間相互作用も現れやすくなることが知られており、その時点で患者の代謝活性を推定することは個別化医療において重要である。in vivo における代謝活性評価として、現在までに in vivo プローブ薬物投与後の体内動態測定に基づく方法や遺伝子解析などが検討されてきたが、患者のその時点で代謝活性を評価できる臨床応用可能な定量的かつ迅速簡便な評価法の確立には至っていないのが現状である。そこで我々は、簡便・迅速性や安全性および患者負担の少なさの観点から安定同位体である ^{13}C -標識化合物を用いた ^{13}C -呼気試験法に着目した。

^{13}C -呼気試験法は、採血を必要としない非侵襲的で患者負担が軽微な方法であり、 ^{13}C -標識化合物投与後に代謝などにより脱離した ^{13}C が最終的に呼気中へ $^{13}\text{CO}_2$ として排泄される機序を利用し、呼気中へ排出された $^{13}\text{CO}_2$ の変動により評価を行う。我々はまず、CYP3A 代謝能の in vivo 評価系として ^{13}C -エリスロマイシンを用いた呼気試験について小動物を用いた検討を行った¹⁾。しかし、臨床における高投与量の必要性などから、 ^{13}C -エリスロマイシンに代わる新たな ^{13}C -プローブとして ^{13}C -リドカインに着目し検討を行ってきた。

リドカインは、主に CYP3A4 および 1A2 により代謝され N-脱エチル化される²⁾。その際に脱離したエチル基が CO_2 となり呼気中へ排泄される (Fig.1)。初回通過効果が高く、経口投与ではバイオアベイラビリティが低いことが知られている。我々は既に、既知の CYP3A 阻害薬により代謝能を変動させた小動物において、 ^{13}C -リドカイン経口投与後の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 排泄が変動することを確認したが、その呼気反応変動の詳細や薬物代謝能との関係性は不明であった。

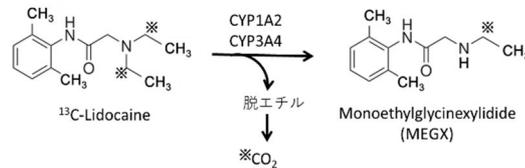


Fig.1 ^{13}C -リドカインの代謝
※ ^{13}C 標識部位

2. 研究の目的

本研究では、ヘリコバクターピロリ菌感染診断にも臨床使用されている ^{13}C -呼気試験法を応用し、 ^{13}C -リドカイン経口投与後の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 変動を測定することにより、患者個々の薬物代謝能を定量的に評価する新たな評価系の検討を試みた。 ^{13}C -リドカイン経口投与後の呼気変動が薬物代謝酵素の活性変動を反映していることを、小動物を用いて呼気試験および動態試験、生理学的動態モデル (PBPK モデル) 解析により明らかとすることを目的とした。さらに、CYP3A の代表的基質であり、古くから CYP3A 代謝活性評価に用いられているミダゾラム動態試験法との比較検討を行うことにより、 ^{13}C -リドカイン呼気試験による CYP3A 代謝能評価の可能性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ^{13}C -リドカイン呼気試験

ddY 系雄性マウスを用いて実験を行った。一晩絶食後、 $^{13}\text{C}_2$ -リドカイン (以下、 ^{13}C -リドカイン) 5 mg/kg を経口投与し、投与前および投与後 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80 分に、呼気デバイスを用いて呼気バッグに呼気 約 100 mL を採取した。得られた呼気サンプル中の $^{13}\text{CO}_2$ 変動 ($^{13}\text{CO}_2$ (%)) を赤外分光分析装置 POC-one® (大塚電子 (株)) を用いて測定した。

代謝能の変動には、既知の CYP 阻害薬であるケトコナゾール (KCZ) (CYP3A 阻害) およびシプロフロキサシン (CPFX) (CYP1A) を用いた。KCZ は ^{13}C -リドカイン投与 1 時間前に 50 mg/kg を経口投与、CPFX は 10 mg/kg 1 日 2 回経口投与 (3 日間) を行い、代謝能変動群とした。代謝能変動群においても ^{13}C -リドカイン呼気試験を実施し、コントロール群と比較した。また、 ^{13}C -リドカイン 0.2 mg/kg 静脈内投与においても呼気試験を実施し、経口投与後の呼気反応と比較した。なお、本研究において用いた ^{13}C -リドカインは、松山大学薬学部にて合成されたものを使用した。

(2) ^{13}C -リドカイン動態試験

一晩絶食した ddY 系雄性マウスに ^{13}C -リドカイン経口投与 (5 mg/kg) あるいは静脈内投与 (0.2 mg/kg) し、投与前および投与後 2, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 80 分に尾静脈より血液 約 20 μL をヘマトクリット管に採取した。採取した血液は、遠心分離を行って血漿を分取した。代謝活性変動群では、呼気試験と同様に、KCZ あるいは CPFX の前投与を行った。

得られた血漿 5 μL を用いてアセトニトリルによる除タンパク前処理を行い、LC-MS/MS 法にて血漿中 ^{13}C -リドカイン濃度を測定した。

(3) 生理学的動態(PBPK)モデル解析

コントロール群における ^{13}C -リドカイン呼気試験呼気反応推移および血漿中 ^{13}C -リドカイン濃度推移を用いて、 ^{13}C -リドカイン呼気試験の呼気反応推移を記述する生理学的動態(PBPK)モデルを新たに構築した(Fig. 2)。

既報³⁾のデータより ^{13}C -リドカインは小腸および肝臓中で消失するものとし、血液、組織容積、血液流量などの生理学値およびリドカインの血漿中非タンパク結合率 (f_p)、血液/血漿中濃度比 (B/P ratio)、みかけの組織移行率 (K_{papp})などは既報に基づき設定した³⁻⁵⁾。経口投与時のバイオアベイラビリティは、本研究における動態試験により得られた値を用いた。

呼気中への $^{13}\text{CO}_2$ 排出推移に関しては、 ^{13}C -代謝物と血液中重炭酸イオン ($\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$) を表すコンパートメント、ならびに $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ の slow turnover pool のコンパートメントを設定した。 ^{13}C -代謝物は、小腸および肝臓における代謝で生成されるものとし、 $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ への変換は速やかであり律速ではないと仮定した。呼気試験の呼気反応パラメータである $^{13}\text{CO}_2$ (%)と $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ の関係は、既報の方法に基づき¹⁾、定数 P1 および P2 を用いて以下の式で表した。

$$\Delta^{13}\text{CO}_2(\%) = P1 + P2 \cdot X_{\text{H}^{13}\text{CO}_3^-} \quad (\text{Eq. 1})$$

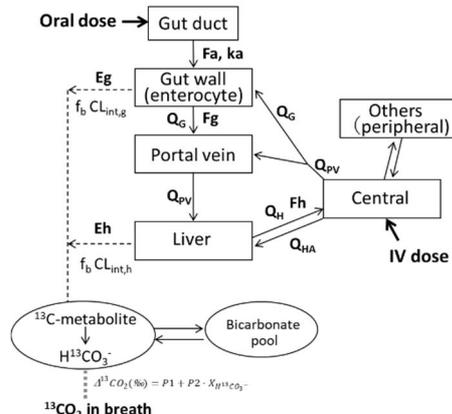


Fig.2 構築した生理学的動態学(PBPK)モデルの概要

(4) ミダゾラム動態試験との比較

従来 CYP3A 代謝活性評価に用いられているミダゾラム動態試験との比較検討を行うため、コントロール群および上記呼気試験において呼気反応変動がみられた KCZ による代謝能変動群についてミダゾラム動態試験を行った。

一晩絶食した ddY 系雄性マウスに、ミダゾラム 0.5 mg/kg を経口投与し、投与前および投与後 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240 分に尾静脈より血液約 20 μL をヘマトクリット管に採取した。採取した血液より得られた血漿 10 μL を用いて、血漿中のミダゾラム濃度および代謝物である 1'-OH-ミダゾラム濃度を LC-MS/MS 法にて測定した。代謝能変動群では、ミダゾラム投与 1 時間前に KCZ 50 mg/kg を経口投与した。得られたミダゾラム動態パラメータ (CL_{tot}/F 、代謝物/未変化体 AUC 比) を算出し、 ^{13}C -リドカイン呼気反応パラメータとの相関性を検討した。

4. 研究成果

(1) ^{13}C -リドカイン呼気試験

^{13}C -リドカイン呼気試験における呼気反応 ($^{13}\text{CO}_2(\%)$) の推移を Fig.3 に示す。代謝能を変動させた検討において、 ^{13}C -リドカイン経口投与後の呼気反応推移は、KCZ 前投与により特に投与初期において低下したが、CPFX 前投与では大きな変動はみられなかった。このことから、 ^{13}C -リドカイン経口投与後の呼気反応推移は、CYP1A 阻害よりも CYP3A 阻害による影響が大きいと考えられた。また、コントロール群と同程度の血中 ^{13}C -リドカイン濃度をもたらす静注投与時には、呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 排泄がほとんどみられなかったことから、 ^{13}C -リドカイン経口投与後の呼気反応は、小腸から肝臓に至る初回通過効果における代謝が多く寄与していると考えられた。

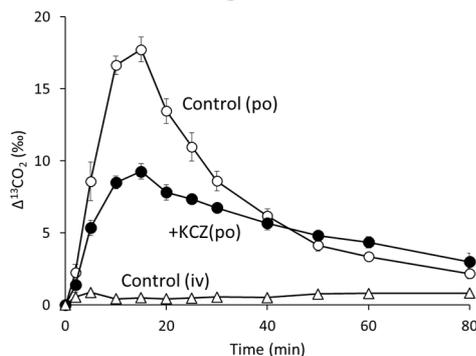


Fig.3 ^{13}C -リドカイン呼気試験における呼気反応推移
po: 経口投与 (5 mg/kg), iv: 静脈内投与 (0.2 mg/kg)

(2) ^{13}C -リドカイン動態試験

前項の経口投与呼気試験と同様の条件において、血漿中 ^{13}C -リドカイン濃度推移を測定し、動態変動を確認した。 ^{13}C -リドカイン静注時には、コントロール群と代謝能変動群で血漿中 ^{13}C -リドカイン濃度推移にほとんど違いはみられなかった。一方、経口投与では、KCZ 前投与群において T_{max} 、 C_{max} 、AUC の有意な上昇がみられた。静脈内および経口投与後の血漿中濃度推移から算出された ^{13}C -リドカイン経口投与時のバイオアベイラビリティは、0.021 であった。リドカインは初回通過効果が高く、血流律速型薬物であることから、得られた結果は妥当なものであった。次に、これらコントロール群の血漿中 ^{13}C -リドカイン濃度推移を入力関数とし、 ^{13}C -リドカイン呼気試験呼気反応推移を記述する生理学的動態(PBPK)モデルの構築を試みた。

(3) PBPK モデル解析

¹³C-リドカイン経口投与呼吸試験における血漿中 ¹³C-リドカイン濃度推移と呼吸反応(¹³CO₂(%))推移を記述する PBPK モデルを確立した(Fig.4)。

本モデルを用いて、小腸および肝臓の固有クリアランス低下による影響を検討したところ、小腸の固有クリアランス低下により、呼吸反応が大きく変動することが示された。また、既報に基づき⁶⁾、肝臓における CYP3A および CYP1A のリドカイン代謝への寄与が同程度であると仮定し、小腸および肝臓での CYP3A 活性を変動させたところ、呼吸試験で得られたデータと同様に、投与後初期の呼吸反応に低下が認められた(Fig.4)。

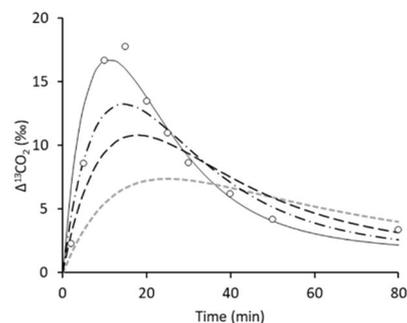


Fig.4 PBPKモデル解析によるCYP3A代謝活性と呼吸反応推移のシミュレーション
実線：コントロール群における呼吸反応の推移 ○：コントロール群 実測値
破線：上から CYP3A代謝活性 0.6, 0.4, 0.2 を仮定した呼吸反応推移

(4) ミダゾラム動態試験との比較

ミダゾラム経口投与後の動態試験において、KCZ 前投与による CYP3A 代謝能変動群では、コントロール群に比較し血漿中未変化体濃度が高値を示し、代謝物である 1'-OH-MDZ 濃度は低値を示した。ミダゾラムの経口クリアランス (CL_{tot}/F) および代謝物と未変化体の AUC 比 (代謝物/未変化体 AUC 比) を算出したところ、KCZ 50 mg/kg 経口投与により CYP3A 代謝能は大きく低下していることが確認された。¹³C-リドカイン呼吸試験の各種呼吸反応パラメータとの関係性を検討した結果、両者の間には正の相関性が認められた(Fig.5)。

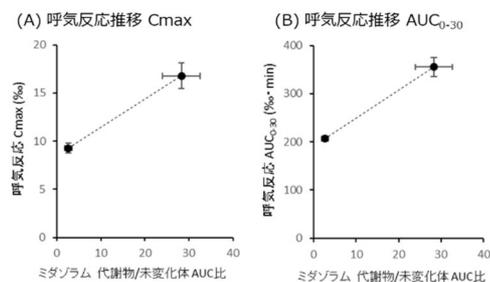


Fig. 5 ¹³C-リドカイン呼吸反応パラメータとミダゾラム動態試験

本研究により、¹³C-リドカイン経口投与時の呼吸反応は、初回通過効果における代謝の評価系として適正であることが示唆された。また、従来法であるミダゾラム動態試験法との間に相関性が認められ、本呼吸試験法により CYP3A の代謝変動を迅速簡便に定量的に評価できる可能性が示された。今後、定量性についてより詳細な検討をすすめることでこの新たな呼吸試験法が確立されれば、臨床現場において非侵襲的かつ迅速簡便に患者個々の薬物代謝能を評価することが可能となり、適正な個別化薬物療法に大きく貢献できると考えられる。本研究では、その基礎データの構築と従来の評価方法との比較検討を行い、本評価法の確立に重要な情報を構築できたと考える。

< 引用文献 >

- Sugiyama E, Kikuchi A, Inada M, Sato H. The use of ¹³C-erythromycin as an in vivo probe to evaluate CYP3A-mediated drug interactions in rats. *J Pharm Sci*, 2011, 100(9):3995-4005.
- Wang JS, Backman JT, Taavitsainen P, Neuvonen PJ, Kivistö KT. Involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in Lidocaine N-deethylation and 3-hydroxylation in Humans. *Drug Metab Dispos*. 2000, 28(8):959-65.
- Keenaghan JB, Boyes RN. The Tissue Distribution, Metabolism and Excretion of Lidocaine in Rats, Guinea Pigs, Dogs and Man. *J Pharmacol Exp Ther*. 1972, 180(2):454-63.
- Yang QJ, Bukuroshi P, Quach HP, Chow ECY, Pang KS. Highlighting Vitamin D Receptor-Targeted Activities of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Mice via Physiologically Based Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling. *Drug Metab Dispos*. 2018, 46(1):75-87.
- Brussee JM, Yu H, Krekels EHJ, De Roos B, Brill MJE, Van den Anker JN, Rostami-Hodjegan A, De Wildt SN, Knibbe CAJ. First-Pass CYP3A-Mediated Metabolism of Midazolam in the Gut Wall and Liver in Preterm Neonates. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2018, 7(6):374-383.
- Wang JS, Backman JT, Taavitsainen P, Neuvonen PJ, Kivistö KT. Involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in lidocaine N-deethylation and 3-hydroxylation in humans. *Drug Metab Dispos*. 2000, 28(8):959-65.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 杉山恵理花、谷口愉香、青山彩果、小倉理夏子、田島正教、稲田睦、見留英路、明樂一己、佐藤均 |
| 2. 発表標題 13C-リドカイン呼気試験を用いた新規 in vivo CYP3A代謝活性評価系の検討 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第140年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|