

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870941

研究課題名(和文)薬物代謝酵素阻害による代謝物体内動態変化の要因解明とその評価法の構築

研究課題名(英文)Change in the PK profile of metabolites by inhibition of metabolic enzyme: elucidation of mechanism and establishment of predictive method

研究代表者

片岡 誠 (Kataoka, Makoto)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：00340860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：薬物相互作用惹起時における代謝物の体内動態変化を予測することを目的として、薬物の体内動態に関する詳細な検討を行った。薬物相互作用により、親薬物のみならず代謝物の血中曝露量が著しく増加することを示した。さらに本現象は、ヒトに近いとされるサルを用いた検討でも同様に認められ、臨床でも起こる可能性を示した。また、代謝物の体内動態を決定する要因は、代謝部位における代謝能および薬物相互作用による変化であることを明らかにした。さらに本現象をシミュレーションするための数理モデルの構築を行い、臨床での代謝物の体内動態予測に繋がる知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In order to predict the change in the PK profile of metabolites in DDI induced humans, PK profiles of parent drugs and metabolites in rats and monkeys were investigated. It was found that the systemic exposure of not only parent drugs but also their metabolites was significantly increased by DDI. Furthermore, this phenomenon was also observed in monkeys in which systemic clearance is comparable to that in humans. These findings indicated that significant increase of systemic exposure of metabolites by DDI could observe in humans. Metabolic activity and the change in it by DDI in the part of metabolic organ are important to determine the PK profile of metabolites. The mathematical modeling has been made to simulate our finding phenomenon, which can be useful to understand and predict the change in the PK profile of metabolites by DDI.

研究分野：薬剤学

キーワード：薬物相互作用 CYP3A4 代謝物 CYP阻害

1. 研究開始当初の背景

薬物相互作用による薬物の全身曝露量増大は、以前より深刻な問題とされており、幾度と無く臨床の場で問題となっている。有名な例を挙げると、Ca拮抗薬とその代謝酵素であるCYP3A4を阻害する薬物やグレープフルーツジュース等の併用によって、服用したCa拮抗薬の血中曝露量が著しく上昇することがある。また、CYP3A4等の薬物代謝酵素に不可逆的に結合してその代謝活性を消失させる1-アミノベンゾトリアゾール(ABT)の併用によって、ミダゾラムの消化管上皮細胞内および肝細胞内での代謝が完全に阻害され、著しくミダゾラムの血中曝露量が上昇することがラットを用いた*in vivo*試験で報告されている。一方で、近年、意図的に薬物相互作用を惹起させることによって、目的薬物の血中曝露量を増大させるという手法が注目されており、薬物療法として実際に臨床に適用されている(例: サキナビルとリトナビル)。しかしながら、薬物相互作用が惹起されている状態での代謝物の体内動態に関する研究報告は極めて乏しく、反応性代謝物が生成する場合や、代謝物が毒性を有する場合には、特にその評価は極めて重要であると考えられる。そのため、2005年6月には米国FDAから「代謝物の安全性に関するガイダンス」が、さらに本邦でも2012年2月には「薬物間相互作用の評価に関するドラフトガイダンス(案)」が公表され、特に、新薬が臨床において基質・阻害薬の両方になるケースについて、臨床薬物相互作用試験の必要性を判断するためのdecision treeが数多く明確に示されたことが、大きな反響を呼んでいる。このような背景から鑑みても代謝物の体内動態を正確に予測する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、薬物代謝酵素活性変化時における代謝物全身曝露量変化の要因を解明するとともに、その評価手法を構築することである。生体にとって薬物は一部を除き不必要なものすなわち異物として認識されるため、経口投与された場合、消化管上皮細胞や肝細胞に存在している薬物代謝酵素(主にCYP3A4)によって解毒後、体外へ排出される。この代謝酵素を阻害する薬物の併用あるいは代謝酵素の発現レベルの低下によって、被検薬物の全身曝露量が著しく上昇することが知られている。本研究では、薬物代謝酵素阻害(薬物相互作用)による代謝酵素活性変化の代謝物体内動態への影響を明らかにし、*in vitro*試験からのヒト代謝物体内動態の予測法を構築することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) ラットを用いた薬物相互作用試験

実験手法 ラット(SD, 雄, 250~300 g)にCYP阻害剤であるABT(100 mg/kg)で実験開始の18時間前に経口投与し、薬物相互作用

群(CYP阻害群)ラットとした。非麻酔下でコントロール群とCYP阻害群ラットにモデル薬物を経口投与または頸静脈から単回急速投与し、経時的に採血を行った。血漿中薬物およびその代謝物の濃度はLC-MSMSを用いて測定した。また、両群において、各代謝物の静脈内投与試験も別途遂行した。

解析法 各化合物の動態学的パラメータはMULTI(Yamaoka K. et al., J Pharmacobiodyn 4: 879-85, 1981)を用いて算出した。

(2) ミクロソームを用いた薬物代謝試験

SDラットおよびヒト肝ミクロソームを用いて各薬物の代謝試験を行い、代謝速度の評価を行った。基本的条件は、最終薬物濃度とミクロソーム濃度はそれぞれ1 μMと0.4 mg/mLとした。

(3) サルを用いた薬物相互作用試験

サル(カニクイザル, 雄, 5.7~6.4 kg)を用いクロスオーバー(休薬期間1週間)にて薬物相互作用試験を遂行した。薬物の投与量(静脈内投与)は、0.1 mg/kgとし、阻害剤(ABT, 20 mg/kg)は実験開始2時間前に経口投与した。薬物投与後、経時的に採血を行い、血漿中薬物およびその代謝物の濃度はLC-MSMSを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) ラットを用いた薬物相互作用試験

CYP3Aのモデル薬物としてフェロジピンを用いて、ラット静脈内投与後の体内動態におよぼすABTによるCYP阻害の影響を観察した。その結果、図1に示すように、フェロジピンの全身循環血中からの消失はCYP阻害により

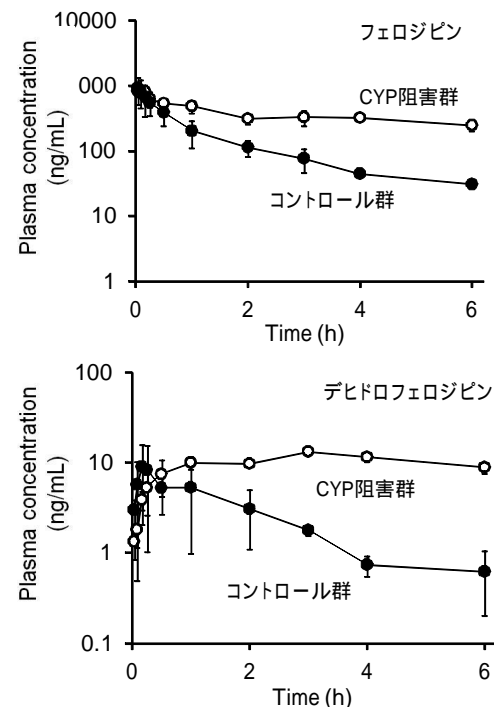


図1 フェロジピン静脈内投与後のフェロジピンとデヒドロフェロジピンの体内動態におよぼすCYP阻害の影響

顕著に低下し、血中曝露量換算で約4.6倍に上昇した。一方、主代謝物であるデヒドロ

フェロジピンの血中曝露量は約7.7倍に上昇しており、親薬物が血中からの消失が遅くなったにも関わらず、代謝物の血中曝露量が著しく増大した。さらに、フェロジピン経口投与時においても同様の現象が確認され、フェロジピンの血中曝露量は約1.3倍の上昇に留まったものの、デヒドロフェロジピンでは約

表2 フェロジピン経口投与後のフェロジピンおよびデヒドロフェロジピンのAUCにおよぼすCYP阻害の影響

	フェロジピン	デヒドロフェロジピン
コントロール群	1784 ± 964.6	8.8 ± 4.6
CYP阻害群	2308 ± 681	107.2 ± 12.2
ratio (阻害/コントロール)	1.3	12.2

(AUC: ng·hr/mL)

12.2倍に上昇した(表1)。本現象を解析するために、別途、代謝物の静脈内投与試験を行った結果、デヒドロフェロジピンもABTにより代謝阻害を受けることが示されたものの、その程度は約1/2と低く、デヒドロフェロジピンの血中からの消失のみでは解析できないことが明らかとなった。

ミダゾラムを用いて同様の検討を行ったところ、フェロジピンで観察された現象よりもさらに顕著な血中曝露量の増大が観察された。そこで、代謝物(1'-OH MDZ, 4-OH MDZ)の静脈内投与試験で得られた消失クリアランスとミダゾラム投与時の代謝物のAUCとの積から両群における各代謝物の血中曝露量を算出した(表2)。コントロール群では、投与したミダゾラムの約5%が代謝物として全身循環血中へ移行したことが示された。一方、CYP阻害群においては、投与したミダゾラムのほぼ全てが代謝物として全身循環血中へ移行したことが明らかとなった。

表2 ラットにおけるミダゾラム投与時の中間代謝物の血中曝露量の算出

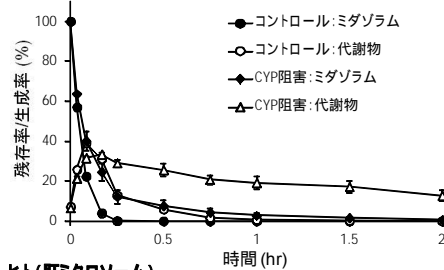
	1'-OH MDZ	4-OH MDZ
コントロール群		
代謝物の血中曝露量(μg)	1.36 ± 0.75	1.49 ± 0.39
代謝物曝露量/投与薬物(%)	2.37 ± 1.38	2.60 ± 0.75
1'-OHミダゾラム + 4-OHミダゾラム = 投与薬物量の4.98%		
CYP阻害群		
代謝物の血中曝露量(μg)	31.1 ± 4.6	26.8 ± 3.5
代謝物曝露量/投与薬物(%)	54.5 ± 8.5	46.8 ± 6.0
1'-OHミダゾラム + 4-OHミダゾラム = 投与薬物量の101.2%		

(2) ミクロソームを用いた薬物代謝試験

ミダゾラムをモデル薬物として、ラット(SD)およびヒトの肝ミクロソームにおけるin vitro薬物代謝試験を行い、ABT添加によるCYP阻害の影響を観察した。また、経時的に薬物濃度および代謝物濃度を測定した。コントロール時と比較して、CYP阻害時ではミダゾラムの消失が顕著に遅延したものの、代謝物の最大生成率は阻害の有無に関わらず同程度であった(図2)。また、代謝物の消失もCYP阻害時において顕著に低下した。さらに代謝物のみを用いた代謝試験を行ったところ、ミクロソーム中で代謝され、また、CYP阻害によって消失速度は約1/2に低下することが示された。そこで、ミクロソーム中におけるミダゾラムおよびその代謝物の消失を数理モデルで解析した。なお、ミダゾラムの

消失速度と代謝物の生成速度は同じものとし、またミダゾラムと代謝物の消失は共に1

ラット(肝ミクロソーム)



ヒト(肝ミクロソーム)

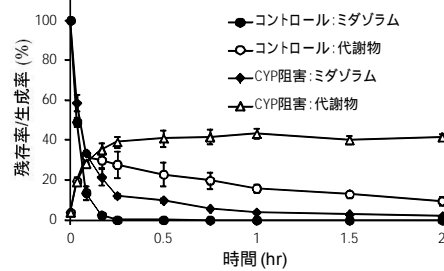
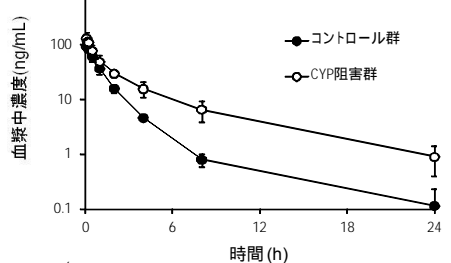


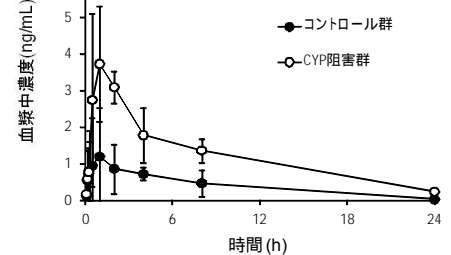
図2 ミクロソームを用いたミダゾラムのin vitro代謝試験におよぼすCYP阻害の影響

次速度式にしたがうものとした。その結果、ミダゾラムの消失速度はCYP阻害により約1/2に低下した。一方、代謝物の消失速度はラットにおいてコントロール時の約15%にまで低下しており、さらにヒトでは2%にまで顕著に低下していた。このミダゾラム代謝試験中の代謝物の消失速度の低下は、代謝物自身

ミダゾラム



1'-OH MDZ



4-OH MDZ

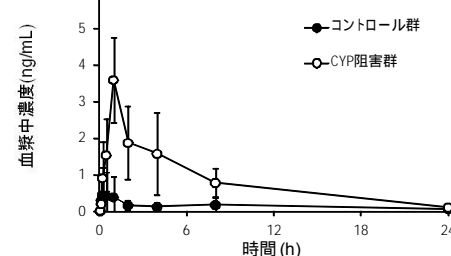


図3 サルにおけるミダゾラム静脈内投与後のミダゾラムとその代謝物の体内動態に及ぼすCYP阻害の影響

の消失速度の低下よりも著しく、また、in vivo 試験で認められた代謝物の著しい血中曝露量の増大と対応する結果であった。さらに、ヒト肝ミクロソームを用いた場合においても、同様の現象が認められ、特に代謝物の消失がラットよりも著しく低下していたことから、ヒトにおいても CYP 阻害時に代謝物の血中曝露量が著しく増大する可能性が示唆された。

(3) サルを用いた薬物相互作用試験

ヒトでの薬物相互作用を想定して、サルにおけるミダゾラムとその代謝物の体内動態におよぼす CYP 阻害の影響を観察した。その結果、図 3 に示すようにラットで観察されたように ABT 前投与によって、ミダゾラムのサル体内からの消失が遅延し、AUC は約 2.2 倍に上昇した。さらに、ラットほどではなかったものの、各代謝物の血中曝露量は約 3.1~5.4 倍に上昇しており、ミダゾラムの消失が遅延したにも関わらず顕著な代謝物の血中曝露量の増大が確認された。(2)のミクロソームの結果と併せても、ヒト CYP 阻害時においても、親薬物とともに代謝物の血中曝露量も増大する可能性が示唆された。

(4) 薬物相互作用の数理モデルの構築

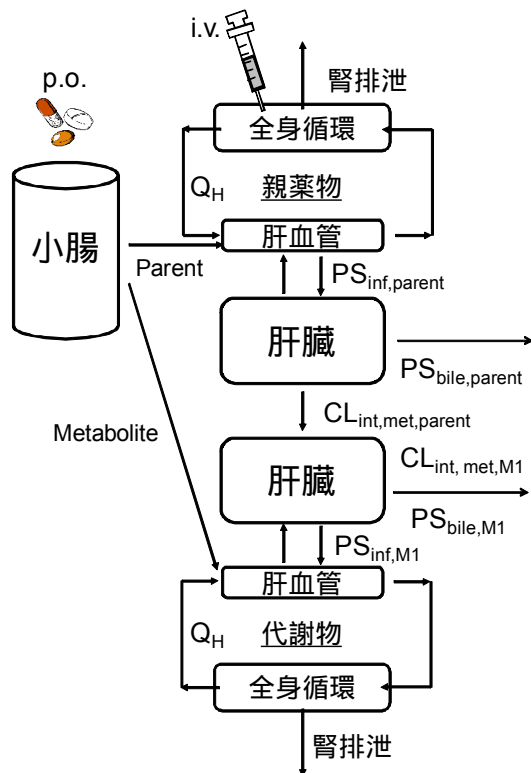


図4 親薬物投与後親薬物とその代謝物の体内動態のモデリング

(1)~(3)の知見を踏まえて、ABT を用いた薬物相互作用による代謝物の体内動態をシミュレーションするための数理モデルの構築を行った。図 4 には、投与された親薬物とその代謝物の体内動態(代謝が主な消失過程)について図示した。静脈内投与した場合、代謝物は肝細胞内でのみ生成するとし、生成した代謝物は更に肝細胞内で代謝される経路と肝細胞内から血中へ移行する過程を組

み込んだ。また、経口投与の場合では、静脈内投与時に追加して、小腸上皮細胞内での薬物代謝過程も図示した。図 4 のモデルにしたがい静脈内投与後の親薬物と代謝物の AUC をシミュレーションするための数理モデルを構築した(式(1)と(2))。本数理モデルより、

$$AUC_{sys,parent} = \frac{D}{\left(\frac{Q_H \cdot f_{ub,parent} \cdot PS_{inf,parent} \cdot PS_{eff,parent} \cdot CL_{int,met,parent}}{Q_H + f_{ub,parent} \cdot PS_{inf,parent} \cdot PS_{eff,parent} + CL_{int,met,parent}} \right)} \quad \text{式(1)}$$

$$AUC_{sys,M1} = \frac{PS_{eff,M1} \cdot D}{f_{ub,M1} \cdot PS_{inf,M1} \cdot CL_{int,met,M1}} \quad \text{式(2)}$$

特に代謝物の体内動態は肝固有クリアランスに強く依存することが明らかとなった。そのため、CYP 阻害により代謝物の代謝酵素も阻害された場合、肝細胞からの代謝物の血中への移行量が増大することが示され、in vivo で認められた現象を説明できることが示唆された。本モデルにより、肝固有クリアランスが薬物相互作用によりどの程度変化するかを予測できれば代謝物の体内動態変化を評価できるものと考えられた。また、ラットで観察された CYP 阻害によるフェロジピン経口投与後の代謝物の著しい血中曝露量の増大は、小腸上皮細胞内での CYP 阻害により、より多くのフェロジピンが門脈中に移行したため、静脈内投与時よりも著しい増加が観察されたものと考えられた。今後は、小腸上皮細胞内での薬物代謝の解析法を構築し、本数理モデルに組み込むことによって経口投与時の代謝物の体内動態予測が可能となるものと考えられた。

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)

[学会発表] (計 8 件)

小野泰明、長谷川翼、本田昌平、東野晴輝、片岡誠、設楽悦久、山下伸二、DDI による医薬品代謝物の体内動態の変動: カニクイザルを用いた検討、日本薬剤学会第 30 年会、2015 年 5 月 23 日、長崎ブリックホール(長崎県、長崎市)

長谷川翼、小野泰明、本田昌平、東野晴輝、片岡誠、設楽悦久、山下伸二、DDI による医薬品代謝物の体内動態の変動: PBPK モデル解析、日本薬剤学会第 30 年会、2015 年 5 月 21 日、長崎新聞文化ホール(長崎県、長崎市)

Hasegawa T, Nakanishi S, Higashino H, Kataoka M, Yamashita S, Kinetic Analysis on the Fluctuation of Systemic Exposure of Drug metabolites Caused by DDI, 2014 American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition, 2014 年 11 月 4 日, San Diego (USA)

畑山翔、長谷川翼、本田昌平、東野晴輝、片岡誠、山下伸二、薬物間相互作用における

医薬品代謝物の体内動態の解析、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014 年 10 月 11 日、京都薬科大学（京都府、京都市）

中西佐都美、長谷川翼、東野晴輝、政岡祥江、片岡誠、佐久間信至、山下伸二、薬物間相互作用による代謝物の血中曝露量の変動(2)：in vitro での検証、日本薬剤学会第 29 年会、2014 年 5 月 22 日、大宮ソニックシティ（埼玉県、さいたま市）

長谷川翼、中西佐都美、畑山翔、東野晴輝、政岡祥江、片岡誠、佐久間信至、山下伸二、薬物間相互作用による代謝物の血中曝露量の変動(1)：速度論的解析、日本薬剤学会第 29 年会、2014 年 5 月 20 日、大宮ソニックシティ（埼玉県、さいたま市）

上田晃大、長谷川翼、政岡祥江、片岡誠、佐久間信至、山下伸二、代謝酵素阻害による代謝物の体内動態の変化：CYP 代謝の阻害は代謝物の血中曝露を増加させる、第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013 年 10 月 12 日、同志社女子大学（京都府、京田辺市）

Hasegawa T, Kataoka M, Ueda A, Hatayama S, Masaoka Y, Sakuma S, Yamashita S, INHIBITION OF CYP-MEDIATED METABOLISM INCREASES THE SYSTEMIC EXPOSURE OF METABOLITES (2): CASE STUDY WITH TERFENADINE, 28th JSSX Annual Meeting, 2013 年 10 月 10 日、タワーホール船橋, (東京都、江戸川区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 誠 (KATAOKA MAKOTO)
摂南大学・薬学部・講師
研究者番号：00340860

(2) 研究協力者

長谷川翼 (HASEGAWA TSUBASA)
摂南大学大学院・薬学研究科・大学院生
中西佐都美 (NAKANISHI SATOMI)
摂南大学・薬学部・学生
畑山翔 (HATAYAMA SYO)
摂南大学・薬学部・学生
小野泰明 (ONO YASUAKI)
摂南大学・薬学部・学生
上田晃大 (UEDA AKIHIRO)
摂南大学・薬学部・学生