S2-09

チトクロームP-450 3Aの阻害による薬物相互作用の予測
: in vitro からin vivo、動物からヒトへ

エーザイ筑波研究所 ○楠部健一、中村俊弘、鈴木弘真、
谷口朋義、中井 弘、伊藤初江、堀江 透
アマシヤム開発研 田井中 均、筒井通夫

PREDICTION OF DRUG-DRUG INTERACTION CAUSED BY CYP3A INHIBITION: FROM IN VITRO TO IN VIVO, FROM ANIMAL TO HUMAN.

Kenichi Kusube, Toshihiro Nakamura, Hiromasa Suzuki, Tomoyosi
Taniguchi, Hiromu Nakai, Hatue Ito, Toru Horie 1)
Hitoshi Tainaka, Michio Tsutsui 2)

- 1) Tukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.
- 2) Central Laboratory, Amersham K.K.

【目的】 E4080は心拍数を軽度下げるとともに、冠血流量増加作用を有する狭心症治療薬をめざした化合物である^{1,2)}。化学構造はイミダゾール

Fig.1. Chemical structure of E4080.

基を有するホモベラトリルアミン誘導体であり、このイミダゾール基が経口有効性に必須である。イミダゾール基を有することからチトクロームP450 への影響が懸念され、薬物相互作用の面から詳細な検討が要求される。

【方法】 *In vitro* study

基質結合差スペクトル ラット、ビーグル、アカゲザルおよびヒト肝ミクロソームにE4080を添加してP450とE4080の基質結合差スペクトルを紫外可視分光光度計を用いて測定し、393 nm と429 nm の吸光度差を解析した。

antipyrene代謝分子種の検討 1) ワクシニアウイルスによって10種のヒトP450を発現させたHepG2cellを用いてantipyreneの代謝を行い、代謝物をHPLCにより測定した。2) 10種の個体別ヒト肝ミクロソームを用いてantipyreneの代謝物をHPLCにて測定した。各代謝物の生成量と個体別肝ミクロソームの標準基質における各分子種の活性との相関を検討した。

ラット肝ミクロソームを用いたE4080の阻害分子種の検討 Testosterone代謝物7 α 、6 β 、16 α 、16 β および2 α 水酸化体の生成をHPLCにて測定した。

ヒト肝ミクロソームを用いたE4080の阻害分子種の検討 7種の特異的なP450分子種で代謝される標準基質の代謝に対するE4080の影響を検討した。

cortisol代謝分子種およびE4080影響の検討 ワクシニアウイルスによって10種のヒトP450を発現させたHepG2cellを用い、cortisol代謝物である6 β -hydroxycortisol(6 β -OHF)を

HPLCにて測定した。また、ヒト肝ミクロソームを用いて、cortisol代謝に及ぼす3A抗体の影響を検討した。同様にE4080がcortisolの6 β 水酸化に及ぼす影響について検討した。

In vivo study

薬効血中濃度相関 麻酔および無麻酔犬にE4080を定速静注し、冠血流量(CBF)、心拍数(HR)および血圧(mAoP)をモニターするとともに血漿中未変化体濃度をHPLCにより測定し有効血漿中未変化体濃度を推定した。

各種動物E4080 pharmacokinetics ラット、ビーグルおよびアカゲザルにE4080を静脈内投与および経口投与しファーマコキネティックパラメータを求めた。

各種動物antipyrine clearance test ラット、ビーグル、およびアカゲザルにE4080を経口投与し、投与後30分時にantipyrineを静脈内投与し血漿中antipyrine濃度をHPLCにより測定した。

Clinical study

ヒト臨床第一相試験における血中濃度推移および尿中6 β -OHFの測定 ヒト臨床第一相試験におけるE4080 10、30、100mg/man投与時の血漿中未変化体濃度をHPLCにより測定した。また、尿中の6 β -OHFをHPLCにより測定した。

【結果・考察】

〈薬効血中濃度相関〉 E4080の血漿中未変化体濃度と薬理作用(冠血流量、心拍数、血圧)は麻酔犬、無麻酔犬ともに良好な相関が認められ推定最少有効血漿中未変化体濃度は1~2 μ g/mlと推定された。ラット、ビーグルおよびアカゲザルに経口投与した際のpharmacokineticsを検討した結果、有効血中濃度に到達するための投与量はラットで20mg/kg、ビーグル、アカゲザルでは10mg/kgと判断された。また、いずれの動物種においても薬効用量範囲で投与量とC_{max}、AUCとの間に非線形性が認められた。

〈p450基質結合差スペクトル〉 各種動物の肝ミクロソームを用いてE4080と肝チトクロームP450の親和性を調べた。P450ヘムとイミダゾール基の結合³⁾に基づくと思われる極大432nm 極小393nmのType II スペクトルがラット、ビーグル、アカゲザルおよびヒト肝ミクロソームにおいて認められ、E4080と肝チトクロームP450との強い親和性が示唆された。

〈アンチピリンクリアランステスト〉 肝薬物代謝酵素阻害作用をin vivoで確かめるためantipyrine⁴⁾を用いてクリアランステストを行った。推定薬効量においてラット、ビーグルおよびアカゲザルいずれの動物種においてもantipyrineの半減期の延長、クリアランスの低下が認められin vivoにおいてE4080のP450阻害作用が認められた。

〈アンチピリンのヒト代謝P450分子種の特異性〉 E4080のantipyrine代謝阻害に関与する分子種を検討するためヒトP450発現系⁵⁾を用いてin vitroにおけるantipyrine代謝を検討した。antipyrineの3種の代謝物4-hydroxyantipyrine(OHA)、3-hydroxy-methylantipyrine(HMA)、

norantipyrine(NORA)はそれぞれOHAはCYP1A2および3A4、HMAはCYP1A2および2C9、NORAは2C9で主に生成することが確認された。また、10種の個体別ヒト肝ミクロソームによるそれぞれの代謝物の生成量と標準基質活性との間にも先の分子種との相関傾向が認められた。この結果からantipyrineは複数種の肝チトクロームP450によって代謝されることが裏付けられ、特にヒトにおけるmajorなP450分子種⁶⁾ (3A, 2C) を反映することからantipyrineクリアランス薬物代謝酵素阻害試験の妥当性が検証できた。

〈ラットおよびヒトにおけるE4080の阻害分子種〉 ラット肝ミクロソームを用いたtestosterone代謝⁷⁾に及ぼすE4080の影響についてを検討した。E4080は6 β および16 β の水酸化を強く阻害したことからラットにおいてCYP2Bおよび3Aを阻害することが確認された。さらにヒト肝ミクロソームを用いて阻害分子種を検討した。E4080は7-benzyloxy-resolfin(IC₅₀ 5 μ M)、tolbutamide(IC₅₀ 2 μ M)、bufuralol(IC₅₀ 0.5 μ M)、testosterone(IC₅₀ 2 μ M)の代謝を阻害し7-ethoxyresolfin、coumarin、anilineの代謝には影響を与えなかった。従ってE4080はヒトにおいてCYP2B6、2C9、2D6、3A4を阻害するが、CYP1A2、2A6、2E1には影響を与えないことが示された。

〈in vitro コルチゾール代謝〉 ヒトin vivoにおける非侵襲的な薬物代謝酵素の阻害および誘導マーカーとして尿中の6 β -OHFの測定はP4503Aへの影響を反映することが報告されている⁸⁾。これをin vitroで確かめるための検討を行った。ヒト発現系を用いcortisolの代謝を行った結果、代謝物である6 β -OHFは主にCYP3A4によって生成することが確認され、またヒト肝ミクロソーム代謝においてCYP3A抗体によりこの生成が抑えられたことからcortisolから6 β -OHFへの代謝はCYP3Aが関与していることが裏付けられた。さらにE4080はヒト肝ミクロソームによるcortisolから6 β -OHFへの代謝を阻害した(K_i=約7 μ M)ことからヒトphase I臨床試験において尿中の6 β -OHFの測定を試みた。

〈phase I 臨床試験〉 ヒト臨床試験第一相においてE4080 100 mg/man 投与時の血漿中未変化体濃度は5例の平均でT_{max} 0.73 hr、C_{max} 472.2 ng/ml、AUC 747.5 ng $\cdot$ hr/mlとビーグル、アカゲザルにおける3 mg/kg 投与時の血漿中未変化体濃度推移に近似していた。しかし、個体別には大きなバラツキが認められ、尿中に排泄された6 β -OHFの量にも個体差が認められた。E4080投与後6時間までに排泄された6 β -OHF量とAUCの間にはAUCが大きな個体ほど尿中に排泄された6 β -OHFの量が少ないという相関傾向が認められた。従ってE4080は臨床においてもCYP3Aを阻害する可能性が強く示唆された。CYP3Aは臨床における薬物相互作用に最も

留意すべき分子種であり、E4080の臨床効果を確認するために増量することは臨床上、問題が生ずる可能性が予測された。

【結論】薬物相互作用をin vitro からin vivo、動物からヒトへ予測することはこれからの新薬開発には重要な課題であり、今後も知見を積み重ね創薬の初期段階にこれらの手法を生かし意志決定していくことが重要である。

【ABSTRACT】 Inhibitory effect of E4080 on the cytochrome P450 was studied using laboratory animals in vitro and in vivo.

In vitro study E4080 has a high affinity for P450 heme in rat, dog, monkey and human liver microsomes. In rat microsomes, E4080 inhibited testosterone 6 β and 16 β - hydroxylase which are involved in CYP2B and CYP3A. Using human microsomes, E4080 inhibited metabolism of 7-benzoyloxyresorfin, tolbutamide, bufuralol and testosterone. These results suggest that E4080 inhibits CYP 2B6, 2C9, 2D6 and 3A4 in human liver microsomes.

In vivo study E4080 prolonged antipyrine half-life and decreased antipyrine clearance in rats, dogs and monkeys at the doses of 10mg/kg which exert pharmacological effect postulated from the minimal effective plasma concentrations(1- 2 μ g/ml). The results may be suggested that E4080 interacts with antipyrine metabolism which is thought to be carried out by CYP 1A, 2C and 3A.

In the clinical trial E4080 (100mg/man) decreased the excretion of urinary 6 β - hydroxycortisol which is a marker of human hepatic cytochrome P4503A induction and inhibition.

In conclusion, it is suspected that E4080 inhibits CYP3A not only in animals, but also in human and should be noticed drug-drug interaction in clinical use.

【REFERENCES】

- 1) Kawamura et al., Eur. J. Pharm., 203 399-404 (1991).
- 2) Adachi et al., Eur. J. Pharm., 268 1-6 (1993).
- 3) Murray et al., Drug Metabolism, Reviews., 18 55-81 (1987).
- 4) Vessel et al., Clin. Pharmacol. Ther., 26 275-286 (1979).
- 5) "Methods in Enzymology", 206 85-92 Academic Press INC.(1991)
- 6) Shimada et al., J.Pharm. Exper. Ther., 270 414-423 (1979).
- 7) "Methods in Enzymology", 206 458 Academic Press INC.(1991)
- 8) Ged et al., Br. J. Clin. Pharmac., 28 373-387 (1989).