クアゼパムおよびその代謝物のヒトにおける代謝： 代謝酵素の同定および薬物間相互作用に関する検討

藤崎 浩, 廣津 京一, 小川 孝行, 水城 浩一, 水田 博彰
有馬 徳行

Metabolism of Quazepam and its Metabolites in Humans: Identification of Metabolic Enzymes and Evaluation of Drug Interaction In Vitro

Hiroshi FUJISAKI, Kyouichi HIROTSU, Takayuki OGAWA, Kouichi MIZUKI, Hiroaki MIZUTA and Noriyuki ARIMA

Pharmacokinetics Laboratories, Pharmaceuticals Research Division, Mitsubishi Pharma Corporation, Fukuoka

Summary: The species of enzymes involved in human metabolism of quazepam and its metabolites M4 and M6 were clarified, and the effects of these compounds on activities of major human P450 isozymes were also evaluated. To identify the CYP isozymes involved, nine kinds of cDNA-expressed human CYPs (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, and CYP4A11) were used to clarify each metabolic reaction. Moreover, inhibitory study was performed to identify the major CYP isozymes responsible for the metabolism of each compound, using human liver microsomes as the enzyme sources, anti-P450 antibodies and anti-P450 antiserum. In addition, flavin-containing monooxygenase (FMO) was examined for its involvement in the metabolism of quazepam to M4. The results revealed that the metabolism of quazepam to M4 was catalyzed by two CYP isozymes, i.e. CYP2C9 and CYP3A4. FMO was found not to be involved in this reaction. The metabolism from M4 to M5 and from M4 to M6 was catalyzed by CYP3A4 and mainly by CYP2C9 and CYP3A4, respectively. Furthermore, M6 was found to be metabolized to M7 by CYP3A4. Next, quazepam, M4, and M6 were examined for their inhibitory effects on the metabolic activities of major human drug metabolizing CYPs (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4). Here, cDNA-expressed human CYPs as enzyme sources and typical substrates for each CYP isozymes were used. The results indicated that each of these compounds has little effects on the metabolic activities of all the CYP isozymes studied.

Key words: Quazepam, *In vitro* metabolism, Human liver microsome, cDNA expressed human P450, Cytochrome P450, FMO, Identification, Drug-drug interaction

緒 言

クアゼパム(Quazepam)は1位にトリフルオロエチル基を有するベンゾジアゼピン系薬剤であり, 睡眠障害の各種症状に優れた効果を示す^{1,2)}. 本化合物のヒトにおける代謝は既に報告されており, **Fig. 1** に示す代謝経路が推定されている³⁾. すなわち, まずクアゼパムの2位が代謝されて2-oxoquazepam (M4)となり, M4は3位の水酸化により3-hydroxy-2-oxoquazepam (M5)へ, *N*-脱トリフルオロエチル化により*N*-desalkyl-2-oxoquazepam (M6)へとそれぞれ代謝され, M6はさらに3位の水酸化により3-hydroxy-*N*-desalkyl-2-oxoquazepam (M7)になる. これら代謝物のうち, M4 および M6 はマウスを用いた試験において電気痙攣抑制作用を有す

ることが報告されている⁴⁾.

近年, 医薬品の安全使用に関して多くの情報が求められている. 特に代謝に関連した薬物間相互作用においてはチトクローム P450 (P450) の関係している事例が多いので⁵⁾, 薬物の代謝に関与する P450 分子種を明らかにすることが重要である. また他薬の代謝に及ぼす影響についても情報を提供する必要がある. そこで本研究ではヒト肝ミクロソームおよび異種細胞に発現させた遺伝子組換えヒト P450 を用いて, クアゼパムの他, 活性代謝物である M4 および M6 についても代謝に関与する P450 分子種を同定した. さらにヒトの薬物代謝に関与する主要な P450 について, 各分子種における典型的な基質を用いて酵素活性を測定し, それらの変動を指標にして P450 で代謝される薬物の体内動態に及ぼすクアゼ

Fig. 1 Metabolic pathways of quazepam in humans

Metabolic pathways quoted from reference 3. The abbreviated name of Compounds named originally.

パム, M4 および M6 の影響を評価した。

実験材料および方法

1. 被験物質および試薬

クアゼパム (化学名: 7-chloro-5-(2-fluorophenyl)-1,3-dihydro-1-(2,2,2-trifluoroethyl)-2H-1,4-benzodiazepine-2-thione), およびその代謝物 M4-M7 の各標品はエスエス製薬㈱から供給されたものを使用した。ジアゼパムは三菱ウェルファーマ㈱にて、オメプラゾールはアストラゼネカにて合成されたものを使用した。7-エトキシレゾルフィン, α -ナフトフラボン, レゾルフィン, クマリン, 7-ヒドロキシクマリン (ウンベリフェロン), スルファフェナゾール, クロルプロパミド, キニジン, アルプレノロールおよびメチマゾールはシグマアルドリッチジャパン㈱から購入したものを使用した。N,N-ジエチルジチオカルバミド酸およびアンドロステンジオンはナカライテスク㈱から購入したものを使用した。S-メフェニトイン, 4'-ヒドロキシメフェニトイン, プフラロール, 1'-ヒドロキシプフラロールおよび6 β -ヒドロキシテストステロンは第一化学薬品㈱から購入したものを使用した。トルブタミドおよびテストステロンは和光純薬工業㈱から購入したものを使用した。ケ

トコナゾールは BIOMOL R. L., Inc から購入したものを使用した。n-オクチルアミンは関東化学㈱から購入したものを使用した。 β -ニコチン酸アミドアデニンジスクレオチド, 還元型, ニナトリウム塩 (NADH), β -ニコチン酸アミドアデニンジスクレオチドリッ酸, 酸化型, ニナトリウム塩 (NADP) およびグルコース 6-リン酸, ニナトリウム塩 (G6P) はベーリンガーマンハイム㈱から購入したものを, グルコース 6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) はオリエンタル酵母㈱から購入したものを使用した。P450 抗体および P450 抗血清 {MAB-2B6/Monoclonal Antibody Inhibitory to CYP2B6 (CYP2B6 抗体), For Inhibition Study, Antiserum for Human CYP2C (goat) (CYP2C 抗血清), MAB-3A4/Monoclonal Antibody Inhibitory to CYP3A4 (CYP3A4 抗体)} は第一化学薬品㈱から購入したものを使用した。その他の試薬は市販特級, HPLC 用または分析用を使用した。

2. ヒト肝ミクロソームおよび発現系 P450

ヒト肝ミクロソーム (n=15, pool) は In Vitro Technologies から供給されたものを使用した。発現系 P450 (コントロール, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 および

CYP4A11: ヒト P450 cDNA をプラスミドベクターに組み込み, ヒト B-リンパ芽球様細胞に導入して発現させたもの. コントロールはベクターのみを導入したもの)は第一化学薬品㈱から購入したものを使用した.

3. *In Vitro* 代謝試験

1) クアゼパム, M4 および M6 の代謝に関与する P450 分子種の検索

NADPH 生成系 buffer {NADH 0.50 mmol/L, NADP 0.42 mmol/L, G6P 3.2 mmol/L および G6PDH 1.8 units/mL となるように 10 mmol/L MgCl₂ 含有 50 mmol/L の Tris-HCl buffer (pH 7.4) で調製} に, 基質および酵素液を加えて全量を 1.0 mL として反応液とした. 基質としてクアゼパム, M4 および M6 (最終濃度はそれぞれ 15 および 150 nmol/L) を使用し, クアゼパムを基質とした時は 0.4 mg protein の, M4 および M6 を基質とした時は 0.9 mg protein の発現系 P450 (CYP1A2, CYP2B6, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP4A11 およびコントロール) をそれぞれ酵素液とした. 発現系 P450 の代わりにヒト肝ミクロソームを加えた群を陽性対照とした. クアゼパムを基質とした時は 60 分間, M4 および M6 を基質とした時は 120 分間, それぞれ 37°C でインキュベートした. インキュベーション終了後, アセトニトリル 4.0 mL を加え攪拌して反応を停止し, 内標準物質としてジアゼパムを加え, 毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離した. 上清 4.0 mL を分取して濃縮乾固させ, 残留物をメタノール 50 μ L に再溶解させて LC/MS/MS による M4-M7 測定用の試料とした. LC は HP1100 システム (Hewlett Packard 社) を使用した. カラムは LUNA C18(2) 150 $\times$ 2.0 mm I.D. (5 μ m) (phenomenex 社) を用い, 温度は 40°C とした. 移動相 A 液に 5 mmol/L 酢酸アンモニウム, B 液にアセトニトリルを用い, 流速は 0.25 mL/min とした. B 液が 0 分: 40%-8 分: 90% となる直線グラジエントで溶出させた. MS/MS は ESI のイオン源を装着した TSQ7000 (Thermo Quest 社) を使用した. ESI イオン化条件としてはスプレー電圧を 4.5 kV, キャピラリー温度を 350°C とし, 正イオンを検出した. シースガスおよび補助ガスは共に窒素ガスを用い, それぞれ 80 psi および約 12 L/min に設定した. Q1 で M4, M5, M6, M7 およびジアゼパムの各プロトン化分子である m/z 371, 387, 289, 305 および 285 を捕捉し, Q2 で 2 mTorr 圧のアルゴンガスにより衝突誘起解離を行い, Q3 でそれぞれのプロダクトイオン, すなわち m/z 259, 341, 140, 259 および 193 をモニターした. M4-M7 とジアゼパムのピーク面積の比を求め, 検量線に当てはめて反応液中の各代謝物濃度を算出した.

2) 各代謝反応に関与する主要な P450 分子種の同定

NADPH 生成系 buffer に, 基質および酵素液を加えて全量を 1.0 mL として反応液とした. 基質としてクアゼパム, M4 および M6 (最終濃度 100 nmol/L) を使用した. クアゼパムを基質とした時は CYP2C 抗血清 10 μ L あるいは CYP3A4 抗体 0.1 mg protein とヒト肝ミクロソーム 0.16 mg protein を混合し, M4 および M6 を基質とした時は CYP2B6 抗体 0.45 mg protein あるいは CYP2C 抗血清 45 μ L あるいは CYP3A4 抗体 0.45 mg protein とヒト肝ミクロソーム 0.72 mg protein を混合し, それぞれ室温で 20 分間インキュベートして酵素液とした. またヒト肝ミクロソームのみと反応させる群を対照とした. なお, 抗体および抗血清添加量は阻害率が頭打ちになる量を予め検討し, 上記のように設定した. クアゼパムを基質とした時は 10 分間, M4 および M6 を基質とした時は 120 分間, それぞれ 37°C でインキュベートした. インキュベーション終了後, アセトニトリル 4.0 mL を加え攪拌して反応を停止し, 内標準物質としてジアゼパムを加え, 毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離した. 上清 4.0 mL を分取して濃縮乾固させ, 残留物をメタノール 50 μ L に再溶解させて LC/MS/MS による M4-M7 測定用の試料とした. M4-M7 の定量値は 3-1) 項の方法にて算出した.

3) クアゼパムの代謝におけるフラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) の関与

NADPH 生成系 buffer {pH 8.5 での実験時のみ, pH 7.4 ではなく pH 8.5 の Tris-HCl buffer で調製した} に基質としてクアゼパム (最終濃度 100 nmol/L) を加えた. ヒト肝ミクロソームを 0.32 mg protein 加え, 全量 1.0 mL として反応液とした. これを 37°C で 10 分間インキュベートした. FMO の関与を確認するため, *n*-オクチルアミンあるいはメチマゾール (最終濃度は *n*-オクチルアミン, メチマゾールともに 10 μ mol/L) を加えた群, FMO を不活性化させるため 45°C で 5 分間加熱したミクロソームを加えた群, 反応液の pH を 8.5 にした群をそれぞれ設定した. インキュベーション終了後, アセトニトリル 4.0 mL を加え攪拌して反応を停止し, 内標準物質としてジアゼパムを加え, 毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離した. 上清 4.0 mL を分取して濃縮乾固させ, 残留物をメタノール 50 μ L に再溶解させて M4 および M5 測定用の試料とした. M4 および M5 の定量値は 3-1) 項の方法にて算出した.

4) CYP1A2 による代謝に及ぼすクアゼパム, M4 および M6 の影響

基質として 7-エトキシレゾルフィン (最終濃度 0.1 および 1.0 μ mol/L) を含む NADPH 生成系 buffer にクアゼパム, M4 および M6 (最終濃度はそれぞれ 1.0, 1.0 および 4.0 μ mol/L) を加え, 7-エトキシレゾルフィン *O*-

脱エチル化活性に及ぼす影響を検討した。また、別途 CYP1A2 の阻害薬である α -ナフトフラボン⁶⁾ (最終濃度 20 $\mu\text{mol/L}$) を加えた群を陽性対照とした。さらに発現系 CYP1A2 を 0.4 mg protein 加え、全量 500 μL として反応液とした。これを 37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベーション終了後、170 mg/mL 炭酸カリウム水溶液 25 μL を加え攪拌して反応を停止し、毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離した上清をレゾルフィン測定用の試料とした。反応液中のレゾルフィンは蛍光強度測定法で定量した。蛍光光度計は蛍光マルチウエルプレートリーダー CytoFluor® (日本パーセプティブ株式会社) を使用した。励起波長は中心波長 530 nm、半値幅 25 nm とし、測定波長は中心波長 580 nm、半値幅 50 nm とした。蛍光強度を測定し、検量線に当てはめて反応液中のレゾルフィン濃度を算出した。

5) CYP2A6 による代謝に及ぼすクアゼパム、M4 および M6 の影響

基質としてクマリン (最終濃度 40 あるいは 400 $\mu\text{mol/L}$) を含む NADPH 生成系 buffer にクアゼパム、M4 および M6 (最終濃度はそれぞれ 1.0, 1.0 および 4.0 $\mu\text{mol/L}$) を加え、クマリン 7-水酸化活性に及ぼす影響を検討した。また、別途 CYP2A6 の阻害薬である *N,N*-ジエチルジチオカルバミド酸⁶⁾ (最終濃度 20 $\mu\text{mol/L}$) を加えた群を陽性対照とした。さらに発現系 CYP2A6 を基質濃度が 40 $\mu\text{mol/L}$ の時は 0.2 mg protein, 400 $\mu\text{mol/L}$ の時は 0.4 mg protein 加え、全量 500 μL として反応液とした。これを 37°C で基質濃度が 40 $\mu\text{mol/L}$ の時は 20 分間、400 $\mu\text{mol/L}$ の時は 45 分間インキュベートした。インキュベーション終了後、170 mg/mL 炭酸カリウム 25 μL を加えて、毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離した上清 50 μL を 100 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 9.0) 950 μL と混合したものをウンベリフェロン測定用の試料とした。反応液中のウンベリフェロンは蛍光強度測定法で定量した。蛍光光度計は蛍光マルチウエルプレートリーダー CytoFluor® (日本パーセプティブ株式会社) を使用した。励起波長は中心波長 360 nm、半値幅 40 nm とし、測定波長は中心波長 460 nm、半値幅 40 nm とした。蛍光強度を測定して、検量線に当てはめて反応液中のウンベリフェロン濃度を算出した。

6) CYP2C9 による代謝に及ぼすクアゼパム、M4 および M6 の影響

基質としてトルブタミド (最終濃度 20 および 200 $\mu\text{mol/L}$) を含む NADPH 生成系 buffer にクアゼパム、M4 および M6 (最終濃度はそれぞれ 1.0, 1.0 および 4.0 $\mu\text{mol/L}$) を加え、トルブタミド水酸化活性に及ぼす影響を検討した。また、別途 CYP2C9 の阻害薬であるスルファフェナゾール⁷⁾ (最終濃度 10 $\mu\text{mol/L}$) を加えた群を陽性対照とした。さらに発現系 CYP2C9 を 0.3 mg pro-

tein 加え、全量 500 μL として反応液とした。これを 37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベーション終了後、70% の 1,2-ジクロロエタンを含有するヘキサン 3.0 mL を加えて反応を停止した。内標準物質であるクロルプロパミドを加え 10 分間振盪し、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離して水層をヒドロキシトルブタミド測定用の試料とした。反応液中のヒドロキシトルブタミドは HPLC-UV 法で定量した。HPLC ポンプ (LC-10AD; 株式会社島津製作所) に、オートインジェクタ (SIL-10A; 株式会社島津製作所) およびカラム (L-column ODS, 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm; 化学品検査協会) を接続し、検出部には UV 検出器 (SPD-10A; 株式会社島津製作所) を接続して波長 230 nm で使用した。データ処理ソフトは CLASS LC-10 (株式会社島津製作所) を使用した。移動相は 5 mmol/L リン酸 buffer (pH 7.0)-メタノール-アセトニトリル (8:1:2, v/v) の混液を使用し、0.6 mL/min で送液した。ヒドロキシトルブタミドとクロルプロパミドのピーク高さの比を求め、検量線に当てはめて反応液中のヒドロキシトルブタミド濃度を算出した。

7) CYP2C19 による代謝に及ぼすクアゼパム、M4 および M6 の影響

基質として *S*-メフェニトイン (最終濃度 20 および 200 $\mu\text{mol/L}$) を含む NADPH 生成系 buffer に、クアゼパム、M4 および M6 (最終濃度はそれぞれ 1.0, 1.0 および 4.0 $\mu\text{mol/L}$) を加え、*S*-メフェニトイン 4'-水酸化活性に及ぼす影響を検討した。また、別途 CYP2C19 の阻害薬であるオメプラゾール⁸⁾ (最終濃度 10 $\mu\text{mol/L}$) を加えた群を陽性対照とした。さらに発現系 CYP2C19 を 0.3 mg protein 加え全量 500 μL として反応液とした。これを 37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベーション終了後、メタノール 250 μL を加えて反応を停止し、内標準物質であるトルブタミドを加えた。これを毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離し、その上清を 4'-ヒドロキシメフェニトイン測定用の試料とした。反応液中の 4'-ヒドロキシメフェニトインは HPLC-UV 法で定量した。HPLC ポンプ (LC-10AD; 株式会社島津製作所) にオートインジェクタ (SIL-10A; 株式会社島津製作所) およびカラム (YMC-Pack ODS-AM AM-314 S-5 μm , 120A, 6.0 mm I.D. $\times$ 300 mm; ワイエムシイ株式会社) を接続し、検出部には UV 検出器 (SPD-10A; 株式会社島津製作所) を接続して波長 204 nm で使用した。データ処理ソフトは CLASS LC-10 (株式会社島津製作所) を使用した。移動相は 5 mmol/L のリン酸 buffer (pH 7.0)-メタノール-アセトニトリル (8:1:2, v/v) の混液を使用し、1.0 mL/min で送液した。4'-ヒドロキシメフェニトインとトルブタミドのピーク高さの比を求め、検量線に当てはめて反応液中の 4'-ヒドロキシメフェニトイン濃度を算出した。

8) CYP2D6 による代謝に及ぼすクアゼパム, M4 および M6 の影響

基質としてブフラロール(最終濃度 10 および 100 $\mu\text{mol/L}$)を含む NADPH 生成系 buffer にクアゼパム, M4 および M6(最終濃度はそれぞれ 1.0, 1.0 および 4.0 $\mu\text{mol/L}$)を加え, ブフラロール 1'-水酸化活性に及ぼす影響を検討した. また, 別途 CYP2D6 の阻害薬であるキニジン⁹⁾(最終濃度 0.2 $\mu\text{mol/L}$)を加えた群を陽性対照とした. さらに発現系 CYP2D6 を 0.3 mg protein 加え全量 500 μL として反応液とした. これを 37°C で 20 分間インキュベートした. インキュベーション終了後, 60% 過塩素酸 25 μL を加えて反応を停止し, 内標準物質であるアルブレノロールを加え, 毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離して上清を 1'-ヒドロキシブフラロール測定用の試料とした. 反応液中の 1'-ヒドロキシブフラロールは HPLC-蛍光法で定量した. HPLC ポンプ(LC-10AD; 株式会社島津製作所)にオートインジェクタ(SIL-10A; 株式会社島津製作所)およびカラム(CAPCELL PAK C18 UG120 S-5 μm , 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm; 株式会社島津製作所)を接続し, 検出部には蛍光検出器(RF-10A; 株式会社島津製作所)を接続して励起波長 252 nm, 蛍光波長 302 nm で使用した. データ処理ソフトは CLASS LC-10(株式会社島津製作所)を使用した. 移動相は 1 mmol/L 過塩素酸-アセトニトリル(7:3, v/v)の混液を使用し, 0.8 mL/min で送液した. 1'-ヒドロキシブフラロールとアルブレノロールのピーク高さの比を求め, 検量線に当てはめて反応液中の 1'-ヒドロキシブフラロール濃度を算出した.

9) CYP3A4 による代謝に及ぼすクアゼパム, M4 および M6 の影響

基質としてテストステロン(最終濃度 20 および 200 $\mu\text{mol/L}$)を含む NADPH 生成系 buffer にクアゼパム, M4 および M6(最終濃度はそれぞれ 1.0, 1.0 および 4.0 $\mu\text{mol/L}$)を加え, テストステロン 6 β -水酸化活性に及ぼす影響を検討した. また, 別途 CYP3A4 の阻害薬であるケトコナゾール¹⁰⁾(最終濃度 0.05 $\mu\text{mol/L}$)を加えた群を陽性対照とした. さらに発現系 CYP3A4 を 0.15 mg protein 加え, 全量 500 μL として反応液とした. これを 37°C で 30 分間インキュベートした. インキュベーション終了後, 酢酸エチル 3.0 mL を加えて反応を停止し, 内標準物質である 4-アンドロステン-3,17-ジオンを加えて, 10 分間振盪した. 振盪後, 毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離して有機層を 2.5 mL 分取した. 分取した有機層を蒸発乾固させた後, メタノール-水(62.5:37.5)の混液 200 μL に再溶解させたものを 6 β -ヒドロキシテストステロン測定用の試料とした. 反応液中の 6 β -ヒドロキシテストステロンは HPLC-UV 法で定量した. HPLC ポンプ(LC-10AD; 株式会社島津製作所)にオートイン

ジェクタ(SIL-10A; 株式会社島津製作所)およびカラム(CAPCELL PAK C18 UG120 S-5 μm , 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm; 株式会社島津製作所)を接続し, 検出部には UV 検出器(SPD-10A; 株式会社島津製作所)を接続して波長 254 nm で使用した. データ処理ソフトは CLASS LC-10(株式会社島津製作所)を使用した. 移動相はメタノール-水(62.5:37.5, v/v)の混液を使用し, 1.0 mL/min で送液した. 6 β -ヒドロキシテストステロンと 4-アンドロステン-3,17-ジオンのピーク高さの比を求め, 検量線に当てはめて反応液中の 6 β -ヒドロキシテストステロン濃度を算出した.

4. データ処理

1) クアゼパム代謝活性ならびに M5, M6 および M7 生成活性

反応液中の代謝物濃度から各代謝物の生成量を算出した. なお代謝物濃度が 0.15 nmol/L 以下は定量限界以下として扱い, 代謝物の生成量を算出できなかった. M4, M5, M6 および M7 生成活性は, 各代謝物の生成量を使用した蛋白量および反応時間で除すことで算出した. クアゼパム代謝活性は 1 次代謝物である M4 の生成活性およびヒト肝ミクロソームおよび発現系 CYP3A4 を酵素源とした時, 反応液中に生成が認められた 2 次代謝物である M5 の生成活性との和とした. 抗体および抗血清を用いた阻害試験ならびに FMO の関与における試験は, 対照群に対する各群の相対活性(%)を算出した.

2) 各種 P450 の酵素活性に及ぼすクアゼパム, M4 および M6 の影響

各試料における定量値から各基質における代謝物の生成量を算出し, 使用した酵素量および反応時間で除すことで酵素活性を算出した. この酵素活性をもとに対照群に対する各群の相対活性(%)を算出した.

結 果

1. クアゼパム, M4 および M6 の代謝に関与する P450 分子種の検索

9 種の発現系 P450 を用いてクアゼパム, M4 および M6 の代謝に関与するヒト P450 分子種を検索した. その結果を Fig. 2 に示す. クアゼパムの代謝活性は CYP2C9 および CYP3A4 において認められた. この時, 陽性対照であるヒト肝ミクロソームを酵素源とした時あるいは発現系 CYP3A4 を酵素源とした時には, 1 次代謝物である M4 の他, 2 次代謝物である M5 の生成も認められたため, M4 と M5 の生成活性の和をクアゼパムの代謝活性として算出した. M4 から M5 の生成活性は CYP3A4 において認められた. M4 から M6 の生成活性は CYP2C9 および CYP3A4 に認められたほか, 弱いながらも CYP2B6 にも認められた. M6 から M7

Fig. 2 Quazepam, M4, and M6 metabolism by cDNA-expressed CYPs

Microsomes from a human lymphoblastoid cell line expressing human CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, and CYP4A11 were incubated with 15 and 150 nmol/L quazepam, M4, and M6, as described in Materials and Methods.

A: Quazepam metabolism (The sum of the formation activity of M4 and M5), **B:** M5 formation from M4, **C:** M6 formation from M4, **D:** M7 formation from M6. Data were mean of duplicate determinations. HLM: Human liver microsome.

の生成活性は CYP3A4 のみに認められた。

2. 各代謝反応に関与する主要な P450 分子種の同定

クアゼパムから M4, M4 から M5 および M6 ならびに M6 から M7 の代謝反応に関して, P450 抗体および P450 抗血清の影響を検討した。その結果を **Fig. 3** に示す。クアゼパムの代謝活性は CYP2C 抗血清の添加および CYP3A4 抗体の添加により, コントロール値の 62.8% および 57.6% にそれぞれ減少した。M4 を基質とした時の M5 の生成活性は CYP3A4 抗体の添加によりコントロール値の 11.8% に減少した。M4 を基質とした時の M6 の生成活性は CYP2B6 抗体を添加しても変化せず, コントロール値の 103.1% であった。一方, CYP2C 抗血清の添加によりコントロール値の 54.1% に, CYP3A4 抗体の添加により 53.6% にそれぞれ減少した。M6 を基質とした時の M7 の生成活性は CYP3A4 抗体の添加により定量限界以下に減少した。

3. クアゼパムの代謝における FMO の関与

クアゼパムの代謝における FMO の関与を検討した。その結果を **Fig. 4** に示す。10 μ mol/L の *n*-オクチルアミンおよびメチマゾールを添加してもクアゼパムの代謝活性は変化せず, コントロール値のそれぞれ 100.8 および 98.1% であった。ヒト肝ミクロソームを 45°C にて 5 分間加熱したものを酵素源として反応させても, 反応液の pH が 8.5 の場合もその活性は変化せず, いずれもコントロール値の 101.9% であった。

4. 各種 P450 の酵素活性に及ぼすクアゼパム, M4 および M6 の影響

クアゼパム, M4 および M6 が各種 P450 の活性に及ぼす影響を検討した。結果を **Fig. 5** に示す。クアゼパム, M4 および M6 は 7-エトキシシレゾルフィン *O*-脱エチル化活性, クマリン 7-水酸化活性, プフラロール 1'-水酸化活性およびテストステロン 6 β -水酸化活性のいずれにもほとんど影響を及ぼさなかった。その他,

Fig. 3 Effects of antibodies and antiserum on quazepam, M4, and M6 metabolism by human liver microsomes. Human liver microsomes (0.16–0.72 mg/mL) were mixed with antibody (10–45 μ L) against CYP2B6 and CYP3A4 or antiserum (10–45 μ L) against human CYP2C. After a 20 min incubation at room temperature, the samples were incubated with quazepam, M4, and M6 (100 nmol/L), as described in Materials and Methods. Uninhibited rates of quazepam metabolism, M5 formation, M6 formation, and M7 formation were 11.531, 0.470, 0.033, and 0.069 pmol/min/mg, respectively.
A: Quazepam metabolism (The sum of the formation activity of M4 and M5), **B:** M5 formation from M4, **C:** M6 formation from M4, **D:** M7 formation from M6. Data were mean $\pm$ S.D. of triplicate determinations. NC: Not calculated, because amount of metabolite was below the quantification limit.

Fig. 4 Effects of methimazole, *n*-octylamine, heat inactivation (45°C, 5 min), and incubation at pH 8.5 on quazepam metabolism. Quazepam metabolic activity was determined as described in Materials and Methods. The control activity was 5.837 pmol/min/mg protein. Data were mean of duplicate determinations.

M4 および M6 はトルブタミド水酸化活性および *S*-メフェニトイン 4'-水酸化活性にはほとんど影響を及ぼさなかった。クアゼパムはトルブタミド水酸化活性および *S*-メフェニトイン 4'-水酸化活性を減少させた。しかしその程度は小さく、それぞれコントロール値の 79.3% および 81.1% であった。また各指標酵素活性に対して陽性対照とした各種 P450 阻害薬は、それぞれの酵素活性を減少させた。

考 察

本研究ではヒトにおけるクアゼパム, M4 および M6 の代謝酵素を同定するとともに、これら化合物がヒトの薬物代謝に関与する主要な P450 種の酵素活性に及ぼす影響を検討した。健康成人男子にクアゼパム 15 mg を経口投与した際のクアゼパム, M4 および M6 の最高血漿中濃度はそれぞれ 40, 29 および 105 nmol/L である(データ未発表)。したがってクアゼパム, M4 および

Fig. 5 Inhibitory effects of quazepam (1 $\mu\text{mol/L}$), M4 (1 $\mu\text{mol/L}$), and M6 (4 $\mu\text{mol/L}$) on human CYP activities. **A:** 7-Ethoxyresorufin *O*-deethylase activities by cDNA-expressed CYP1A2 were determined at 7-ethoxyresorufin concentrations of 0.1 and 1.0 $\mu\text{mol/L}$. The control activities were 0.008 and 0.098 pmol/min/pmol P450, respectively. **B:** Coumarin 7-hydroxylase activities by cDNA-expressed CYP2A6 were determined at coumarin concentrations of 40 and 400 $\mu\text{mol/L}$. The control activities were 7.616 and 5.089 pmol/min/pmol P450, respectively. **C:** Tolbutamide hydroxylase activities by cDNA-expressed CYP2C9 were determined at tolbutamide concentrations of 20 and 200 $\mu\text{mol/L}$. The control activities were 0.590 and 2.247 pmol/min/pmol P450, respectively. **D:** *S*-Mephenytoin 4'-hydroxylase activities by cDNA-expressed CYP2C19 were determined at *S*-mephenytoin concentrations of 20 and 200 $\mu\text{mol/L}$. The control activities were 3.605 and 6.123 pmol/min/pmol P450, respectively. **E:** Bufuralol 1'-hydroxylase activities by cDNA-expressed CYP2D6 were determined at bufuralol concentrations of 10 and 100 $\mu\text{mol/L}$. The control activities were 2.024 and 4.059 pmol/min/pmol P450, respectively. **F:** Testosterone 6 β -hydroxylase activities by cDNA-expressed CYP3A4 were determined at testosterone concentrations of 20 and 200 $\mu\text{mol/L}$. The control activities were 1.928 and 8.498 pmol/min/pmol P450, respectively. Data were mean $\pm$ S.D. of triplicate determinations. NC: Not calculated, because amount of metabolite was below the quantification limit.

M6 の代謝酵素を同定する試験は、いずれの化合物においても 15–150 nmol/L の濃度範囲で行った。まず発現系 P450 を用いて各代謝反応に関与する P450 分子種を検索した。次に、ヒト肝ミクロソームを酵素源として、発現系 P450 において活性を示した分子種の抗体および抗血清による阻害効果から、各代謝反応に関与する主要な P450 分子種を同定した。

クアゼパムの代謝には、発現系 P450 を用いた検討から CYP2C9 および CYP3A4 の関与が示唆された。ヒト肝ミクロソームを酵素源として CYP2C 抗血清および CYP3A4 抗体の影響を検討したところ、いずれも P450 活性を同程度に阻害した。したがってクアゼパムの代謝には CYP2C9 および CYP3A4 が関与していることは明らかである。1 代謝反応に 2 種の P450 が関与している例としてオメプラゾールの 5 位の水酸化反応がある。この反応は CYP2C19 および CYP3A4 により触媒されており、それぞれの分子種の寄与率は個々の生体における発現量に依存するとの報告がある¹¹⁾。したがって、M4 生成における CYP2C9 と CYP3A4 の寄与率も個々のヒトにおける両 P450 の発現量の違いによって変動すると推測される。一方、クアゼパムから M4 への代謝に関与する酵素として、その反応様式から P450 以外に FMO の可能性もある¹²⁾。そこで M4 生成における FMO の関与を検討した。FMO の活性化剤である *n*-オクチルアミン¹³⁾ の添加および FMO の至適 pH である pH 8.5 付近¹⁴⁾ の条件において、クアゼパムの代謝活性は増加しなかった。また 45°C で 5 分間加熱して FMO を不活性化¹⁵⁾ させたヒト肝ミクロソームを酵素源としても活性は減少しなかった。さらに FMO の阻害剤であるメチマゾール¹⁶⁾ を反応系に添加した場合、クアゼパムの代謝活性は減少しなかった。これらのことからクアゼパムから M4 への代謝に FMO は関与しないと考える。

M4 から M5 への代謝では、発現系 P450 を用いた検討において主として CYP3A4 が活性を示した。またヒト肝ミクロソームを酵素源とした時、CYP3A4 抗体を添加すると活性が著しく減少したので、本反応を触媒する P450 分子種は CYP3A4 であると同定した。M4 から M6 への代謝では、発現系 P450 を用いた検討において CYP2B6, CYP2C9 および CYP3A4 が活性を示した。これら 3 種の P450 に対する抗体および抗血清を用いて M6 生成に関与する主要な P450 分子種について検討した。M6 の生成活性は CYP2B6 抗体を添加してもほとんど変化しなかったが、CYP2C 抗血清および CYP3A4 抗体を添加すると同程度阻害された。したがって M4 から M6 の生成には CYP2B6 の関与は少なく、CYP2C9 および CYP3A4 の 2 分子種が主として関与していると考えられる。本代謝反応における CYP2C9 および CYP3A4 の寄与率も M4 の生成と同様に、2 つの分子

種の発現量に依存している可能性が高い。M6 から M7 への代謝では発現系 P450 を用いた検討において CYP3A4 が活性を示した。またヒト肝ミクロソームを酵素源とした時、CYP3A4 抗体を添加すると活性が著しく減少したので、本反応を触媒する P450 分子種は CYP3A4 であると同定した。以上の結果から、クアゼパム全般の代謝には主として CYP2C9 および CYP3A4 の 2 種が関与することを明らかにした。クアゼパムの代謝経路および各代謝反応に関与する P450 分子種を Fig. 6 に示す。CYP2C9 を強く阻害する薬物としてサルファ剤が知られている¹⁷⁾。また CYP3A4 を強く阻害する薬物としてアゾール系抗真菌薬、マクロライド系抗真菌薬および HIV プロテアーゼ阻害薬などが知られている^{17,18)}。クアゼパムとこれら薬物を併用すると、代謝阻害のためにクアゼパムおよびその代謝物の血中濃度が上昇する可能性がある。しかしクアゼパムの代謝には CYP2C9 および CYP3A4 の 2 分子種が関与しているので、一方の分子種の阻害剤と併用した時、あるいは両方の分子種の阻害剤と併用した時に、クアゼパムの代謝クリアランスがどの程度変動するのかということを予測するため、両分子種の寄与率も併せて速度論的な解析が必要である。

次にクアゼパム、M4 および M6 が P450 で代謝される薬物の代謝動態に及ぼす影響を予測するため、ヒトの薬物代謝に関与する主要な P450 について、それぞれの P450 分子種における典型的な基質を用い、その酵素活性の変動を指標に評価した。CYP1A2 の指標酵素活性として 7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化活性¹⁹⁾ を、CYP2A6 の指標酵素活性としてクマリン 7-水酸化活性¹⁹⁾ を、CYP2C9 の指標酵素活性としてトルブタミド水酸化活性⁹⁾ を、CYP2C19 の指標活性として *S*-メフェニトイン 4'-水酸化活性¹⁹⁾ を、CYP2D6 の指標活性としてブフラロール 1'-水酸化活性⁹⁾ を、CYP3A4 の指標酵素活性としてテストステロン 6 β -水酸化活性⁷⁾ をそれぞれ評価した。In vitro 代謝試験におけるクアゼパムおよび M4 の濃度はそれぞれ 1 μ mol/L, M6 の濃度は 4 μ mol/L とした。これは前述のヒトにクアゼパム 15 mg を投与した際の血中濃度から設定した。クアゼパム、M4 および M6 は検討した 6 種 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 および CYP3A4) の P450 分子種に対する指標酵素活性をほとんど阻害しなかった。このことからクアゼパムは CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 および CYP3A4 で代謝される薬物と併用しても、それら薬物の代謝にほとんど影響を及ぼさないと考える。

要 約

クアゼパムならびにその代謝物 M4 および M6 につ

Fig. 6 Major enzymatic pathways in the metabolism of quazepam

いて、ヒトにおける代謝酵素を明らかにするとともに、各種 P450 の活性に及ぼすこれら化合物の影響を検討した。代謝酵素の同定は 9 種の発現系 P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 および CYP4A11) を用いてそれぞれの代謝反応に関与する P450 分子種を検索した。また代謝に関与する主要な P450 分子種を明らかにするため、ヒト肝ミクロソームを酵素源として P450 抗体および P450 抗血清を用いた阻害試験を行った。さらにクアゼパムから M4 の代謝反応に関しては FMO の関与についても検討した。その結果、クアゼパムから M4 への代謝には CYP2C9 および CYP3A4 の 2 分子種が関与することを明らかにした。また本代謝反応に FMO の関与はなかった。M4 から M5 への代謝は CYP3A4 が、M4 から M6 への代謝は主として CYP2C9 および CYP3A4 が触媒することを明らかにした。さらに M6 から M7 への代謝は CYP3A4 が触媒することを明らかにした。

次にクアゼパム、M4 および M6 がヒトの薬物代謝に関与する主要な P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 および CYP3A4) による代謝に及ぼす影響、すなわち発現系 P450 を酵素源として各 P450 の指標酵素活性に及ぼす影響を評価した。その結果、検討したいずれの P450 分子種に対してもクアゼパム、M4 および M6 はほとんど影響を及ぼさないことを明らかにした。

文 献

- 1) Kales M., Scharf B., Bixler E. O., Schweitzer P. K., Jacoby J. A., and Soldatos C. R.: Dose-response studies of quazepam. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **30**: 194-200 (1981).
- 2) Wickstrom E. and Allgulander C.: Comparison of quazepam, flunitrazepam, and placebo as single-dose hypnotics before surgery. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **24**: 67-69 (1983).
- 3) Zampaglione N., Hilbert J. M., Ning J., Chung M., Gural R., and Symchowicz S.: Disposition and metabolic fate of ^{14}C -quazepam in man. *Drug Metab. Dispos.*, **13**: 25-29 (1985).
- 4) Hilbert J. M. and Battista D.: Quazepam and flurazepam: Differential pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics. *J. Clin. Psychiatry*, **52**: 21-26 (1991).
- 5) Bertz R. J. and Granneman G. R.: Use of *in vitro* data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin. Pharmacokinet.*, **32**: 210-258 (1998).
- 6) Chang T. K. H., Gonzalez F. J., and Waxman D. J.: Evaluation of triacetyloleandomycin, α -naphthoflavone and diethyldithiocarbamate as selective chemical probes for inhibition of human cytochromes P450. *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**: 437-442 (1994).
- 7) Newton D. J., Wang R. W., and Lu A. Y. H.: Cytochrome P450 inhibitors: Evaluation of specificities in the *in vitro* metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, **23**: 154-158 (1995).
- 8) Venkatakrishnan K., von Moltke L. L., Duan S. X., Fleishaker, Shader R. I., and Greenblatt D. J.: Kinetic characterization and identification of the enzymes responsible for the hepatic biotransformation of adinazolam and *N*-

- desmethyldiazepam in man. *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**: 265-274 (1998).
- 9) Ring B. J., Binkley S. N., Vandenbranden M., and Wrighton S. A.: *In vitro* interaction of the antipsychotic agent olanzapine with human cytochromes P450 CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **41**: 181-186 (1996).
  - 10) Pearce R. E., Rodrigues A. D., Goldstein J. A., and Parkinson A.: Identification of the human P450 enzymes involved in lansoprazole metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **277**: 805-816 (1996).
  - 11) Yamazaki H., Inoue K., Shaw P. M., Checovich W. J., Guengerich F. P. and Shimada T.: Different contributions of cytochrome P450 2C19 and 3A4 in the oxidation of omeprazole by human liver microsomes: Effects of contents of these two forms in individual human samples. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**: 434-442 (1997).
  - 12) 加藤隆一, 鎌滝哲也(編): 薬物代謝学. 東京化学同人(東京), p10 (2000).
  - 13) Chiba K., Kobayashi K., Itho K., Itho S., Chiba T., Ishizaki T., and Kamataki T.: *N*-oxygenation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by the rat liver flavin-containing monooxygenase expressed in yeast cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **293**: 97-100, (1995).
  - 14) Narimatsu S., Yamamoto S., Kato R., Masubuchi Y., and Horie T.: Contribution of flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450 to imipramine *N*-oxidation in rat hepatic microsomes. *Biol. Pharm. Bull.*, **22**: 567-571 (1999).
  - 15) Rawden H. C., Kokwaro G. O., Ward S. A., and Edwards G.: Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of alendazole by human liver microsomes. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **49**: 313-322 (2000).
  - 16) Ring B. J., Wrighton S. A., Aldridge S. L., Hansen K., Haehner B., and Shipley L. A.: Flavin-containing monooxygenase-mediated *N*-oxidation of the M(1)-muscarinic agonist xanomeline. *Drug Metab. Dispos.*, **27**: 1099-1103 (1999).
  - 17) 北田光一: 薬物代謝酵素(特に P450)の阻害に関する相互作用の基礎知識. 月刊薬事, **38**: 467-479 (1996).
  - 18) Koudriakova T., Iatsimirskaia E., Utkin I., Gangl E., Vouros P., Storozhuk E., Orza D., Marinina J., and Gerber N.: Metabolism of the human immunodeficiency virus protease inhibitors indinavir and ritonavir by human intestinal microsomes and expressed cytochrome P4503A4/3A5: Mechanism-based inactivation of cytochrome P4503A by ritonavir. *Drug Metab. Dispos.*, **26**: 552-561 (1998).
  - 19) Pearce R. E., McIntyre C. J., Madan A., Sanzgiri U., Draper A. J., Bullock P. L., Cook D. C., Burton L. A., Latham J., Nevins C., and Parkinson A.: Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **331**: 145-169 (1996).