Flutamide とニューキノロン系抗生物質の 薬物相互作用の予測

—ヒト肝ミクロソームによる検討—

渡辺紀子^{*1} 合田里佳^{*1} 入江毅^{*2}
山下幸和^{*1}

(受付：2000年8月25日)

In Vitro Effects of Fluoroquinolone Anti-bacterial Agents on Flutamide Metabolism in Human Liver Microsomes

Noriko WATANABE^{*1} Rika GODA^{*1} Tsuyoshi IRIE^{*2}
and Kouwa YAMASHITA^{*1}

^{*1} Pharmacokinetics Group, Pharmaceuticals Group, Nippon Kayaku Co., Ltd.
3-31-12 Shimo, Kita-ku, Tokyo 115-8588, Japan

^{*2} Scientific Affairs Department, Pharmaceuticals Group, Nippon Kayaku Co., Ltd.

Flutamide (FLU), an antiandrogenic drug, is widely used for the treatment of prostate cancer. FLU is metabolized to 2-hydroxyflutamide (OH-FLU) in the liver, and OH-FLU is a major metabolite in both human and rat plasma. It has been reported that OH-FLU is mainly catalyzed by CYP1A2. Also it has been known that several fluoroquinolones inhibit the metabolism of theophylline by CYP1A2 and cause an increase in the plasma level of theophylline.

Therefore, to evaluate the metabolic interactions between FLU and fluoroquinolones, we studied the influence of four fluoroquinolones on the 2-hydroxylation of FLU using human liver microsomes. Levofloxacin and fluoroxacin showed very little inhibition on the generation of OH-FLU, whereas enoxacin (EN) and ciprofloxacin (CP) inhibited the 2-hydroxylation of FLU. EN and CP exhibited a competitive inhibition of the OH-FLU formation with calculated K_i values of 158.5 and 245.6 μ M, respectively. Based on their K_i values, the increase of the AUC of FLU could be predicted to be about 1.7-fold for EN and 1.1-fold for CP, respectively. This study suggests that EN possibly interacts with FLU in patients. However, other fluoroquinolones have no significant effect on the plasma concentration of FLU, so interaction of FLU and fluoroquinolones might not be meaningful clinically.

Key words : flutamide, fluoroquinolones, human liver microsome, drug interaction

^{*1} 日本化薬株式会社創薬本部薬物動態グループ 〒115-8588 東京都北区志茂 3-31-12

^{*2} 日本化薬株式会社東京医薬支店学術部

はじめに

Flutamide (2-methyl-N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl) phenyl]-propanamide, FLU) は、アンドロゲンとアンドロゲン受容体との結合を阻害することにより、抗アンドロゲン作用を示す非ステロイド性の前立腺癌治療薬である。受容体レベルでアンドロゲンの作用を阻害できることから、従来の去勢療法で問題となっていた副腎由来のアンドロゲンの作用も抑えられるので、この去勢療法と併用することで、治療効果の向上が期待され、LH-RH 製剤や除辜術と併用する combined androgen blockade 療法として用いられている。

FLU のヒトおよびラットにおける血漿中主代謝物は、2 位が水酸化された 2-hydroxy-2-methyl-N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl) phenyl]-propanamide (OH-FLU) であり、ヒトにおいては CYP1A2 により生成することが報告されている¹⁾。この OH-FLU は、 C_{max} および AUC が FLU に比べ 10 倍以上高く²⁾、また FLU に比べ抗アンドロゲン作用が約 10 倍強いこと³⁾から、FLU を投与したときの薬効に大きく寄与していると考えられている。

一方、副作用としては、肝機能異常の出現が報告されている。その発現の機序は解明されていないが、OH-FLU への代謝は FLU の薬効のみならず、副作用の発現においても重要と考えられる。

FLU の適応である前立腺癌の患者は高齢者であるため、実際の臨床において種々の薬剤が併用投与されている症例が多く、FLU の効果や副作用において、薬物相互作用の可能性が懸念される。

今回、我々は数種のヒトのチトクローム P450 (以下 P450 と略す) 発現系ミクロソームおよび特異的阻害剤を用いて、FLU の主代謝経路である OH-FLU の生成に関与するヒト P450 分子種について精査した。さらに、同じ CYP1A2 で代謝されるテオフィリンとの相互作用が報告されているニューキノロン系抗生物質⁴⁾が FLU のヒト肝ミクロソームによる代謝に及ぼす影響を調べ、FLU のヒト血漿中濃度に及ぼすこれら抗生物質の影響について予測した。

Fig. 1 (A) FLU, (B) OH-FLU および (C) 内標準物質の化学構造式

実験方法

1. 使用薬剤および試薬

FLU, OH-FLU および内標準物質 (I. S.) N-[4-nitro-3-(tri-fluoromethyl) phenyl]-hexanamide は Schering-Plough 社より供与された (Fig. 1)。各 P450 分子種の阻害剤である 7,8-benzoflavone, quinidine, diethyldithiocarbamate (DDC) および troleandomycin (TAO) は Sigma 社から、sulphaphenazole はウルトラファインケミカル社からそれぞれ購入した。 β -NADPH はオリエンタル酵母工業株式会社から購入した。ニューキノロン系抗生物質である enoxacin (EN) は Sigma 社から、ciprofloxacin (CP) はバイエル薬品株式会社から、floxacin (FL) は杏林製薬株式会社から、levofloxacin (LV) は第一製薬株式会社からそれぞれ購入した。その他の実験に使用した試薬および溶媒は特級品または HPLC 用を用いた。

2. ヒト P450 発現系ミクロソームおよびヒト肝ミクロソーム

遺伝子組換えヒト P450 発現系ミクロソームは、CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9,

Fig. 2 ヒト肝ミクロソーム(3種)のFLU 2-水酸化活性の Eadie-Hofstee plot

2C19, 2D6, 2E1 および 3A4 をそれぞれ発現させたヒト B リンパ芽球細胞から調製したミクロソーム (GENTEST 社製) を用いた。ヒト肝ミクロソーム (Lot No. HHM 0219, 0152, 0193, 0195) は I. I. A. M. (International Institute for Advancement of Medicine) 製のものをを用いた。

3. In vitro 代謝反応

FLU (1~100 μ M) を基質とし, 各種阻害剤, β -NADPH (0.8 mM) 存在下, 0.1 M K-Phosphate buffer (pH 7.4) または 0.1 M Tris buffer (pH 7.5) 中で 37°C で 5 分間ブレインキュベーションした後, ヒト P450 発現系ミクロソーム (0.5 mg microsome protein/ml) またはヒト肝ミクロソーム (0.15 mg microsome protein/ml) を加え, 反応を開始した (反応総量 0.25 ml)。ヒト肝ミクロソームの場合は反応開始 30 分後, ヒト P450 発現系ミクロソームの場合は 2 時間後にトルエン 1 ml を加えて攪拌し, 反応を停止させた。I. S. 500 ng を添加し攪拌した後, 遠心分離 (1,800 $\times$ g, 5 min) し, 上清を得た。上清は減圧下で濃縮乾固し, HPLC 移動相に溶解した。ウルトラフリー C3-LG (ミリポア社) で遠心ろ過 (1,800 $\times$ g, 5 min) した後, LC/MS を用いて生成した OH-FLU を定量し, その生成量から 2-水

化活性を算出した。

4. LC/MS 条件

高速液体クロマトグラフ装置 (HPLC) は GUL-LIVER SERIES PU-980 (日本分光株式会社), 質量分析装置 (MS) は PLATFORM (Micromass 社) を用いた。

HPLC による分離は, カラムとして CAPCELL PAK C₁₈ (UG120, 粒径 5 μ m, 内径 2.0 $\times$ 150 mm, 株式会社資生堂), 移動相に 10 mM 酢酸アンモニウム (pH 5) / アセトニトリル = 45/55 (v/v) を用い, 0.3 ml/min の流速で行った。

MS の測定は, コーン電圧 30 V, キャピラリー電圧 2.5 kV, イオン源温度 180°C に設定し, 陰イオンエレクトロスプレーイオン化 (ESI (-)) - 選択的イオン検出 (SIM) 法で行った。

モニタリングイオンとして, OH-FLU および I. S. 共に [M-H]⁻イオンである m/z 291.0 および m/z 303.0 をそれぞれ用いた。

結 果

ヒト肝ミクロソームにおける FLU の 2-水酸化活性を Eadie-Hofstee の方法によりプロットした (Fig. 2)。また, その図から算出した K_m および V_{max} の値を Table 1 に示した。Eadie-Hofstee

Table 1 ヒト肝ミクロソーム (3 種) の FLU 2-水酸化活性の K_m および V_{max}

	K_{m1}	V_{max1}	V_{max1}/K_{m1}	K_{m2}	V_{max2}	V_{max2}/K_{m2}
HHM 0195				4.78	727.84	152.27
HHM 0193	0.51	43.33	84.96	5.37	311.90	58.08
HHM 0152				3.19	196.51	61.60
Mean				4.45	412.08	90.65
S. D.				1.13	279.47	53.39

単位 ; K_m : μM , V_{max} : pmol/mg protein/min, V_{max}/K_m : $\mu l/mg$ protein/min

Fig. 3 各種ヒト P450 発現系ミクロソームの FLU 2-水酸化活性および肝臓中 P450 含量で補正したときの FLU 2-水酸化活性

plot は、2 種のヒト肝ミクロソームで 1 相性を示し、1 種のヒト肝ミクロソーム (Lot No. HHM-0193) では 2 相性の直線を示したことから、FLU の 2-水酸化活性は、1 分子種または複数の分子種が関与していることが示唆された。このときの K_{m1} 値は $0.51 \mu M$, V_{max1} 値は $43.33 \text{ pmol/mg protein/min}$, K_{m2} 値は $4.45 \pm 1.13 \mu M$, V_{max2} 値

は $412.08 \pm 279.47 \text{ pmol/mg protein/min}$ であった。

Fig. 3 に、各種ヒト P450 発現系ミクロソームによる FLU の 2-水酸化活性および各 P450 分子種の肝臓における組成比で補正した⁵⁾ときの 2-水酸化活性を示した。基質濃度が $1 \mu M$ および $100 \mu M$ のいずれにおいても CYP1A2 が最も高い活

Fig. 4 ヒト肝ミクロソームのFLU 2-水酸化活性に対する各 P450 分子種の特異的阻害剤の影響

Fig. 5 ヒト肝ミクロソームのFLU 2-水酸化活性に対する各種ニューキノロン系抗生物質の影響

性を示した。次いでCYP 1A1, 2C9 および 2C19 が活性を示した。基質濃度 $1 \mu\text{M}$ のとき, CYP1 A1, 2C9, および 2C19 の活性はCYP1A2 に対して, それぞれ $1/4$, $1/6$ および $1/20$ であった。また, 基質濃度 $100 \mu\text{M}$ のときは, それぞれ $1/10$, $1/4$ および $1/20$ であった。CYP2C8, 2E1 および 3A4 は基質濃度 $100 \mu\text{M}$ においてのみ活性を示したが, その程度はCYP1A2 に対して $1/20 \sim 1/70$ と弱かった。

ヒト肝ミクロソームのFLUの2-水酸化活性に及ぼす各ヒトP450分子種の特異的阻害剤の影響をFig. 4に示した。ヒト肝ミクロソームのFLUの2-水酸化活性は, CYP 1A2の特異的阻害剤である7,8-benzoflavoneにより濃度依存的に減少し, $1 \mu\text{M}$ では無添加時の3%であった。また, CYP2Cの特異的阻害剤であるsulphaphenazoleは $3 \mu\text{M}$ 添加したときFLUの2-水酸化活性が無添加時の70%に減少し, 弱い阻害が認められた。

Fig. 6 ヒト肝ミクロソームの FLU 2-水酸化活性に対する (A, B) エノキサシンおよび (C, D) シプロフロキサシンの Lineweaver-Burk plot および Dixon plot
 EN : $K_i = 158.5 \pm 48.4 \mu M$, CP : $K_i = 245.6 \pm 49.8 \mu M$

CYP2D6, 2E1, 3A のそれぞれの特異的阻害剤である quinidine, DDC, TAO による FLU の 2-水酸化活性の阻害はほとんど認められなかった。

ヒト肝ミクロソームを用いて, FLU の 2-水酸化活性に対する各種ニューキノロン系抗生物質の阻害作用を検討した (Fig. 5). FLU の 2-水酸化活性を 50% 阻害する濃度 (IC_{50}) は EN が $162.5 \mu M$, CP が $250 \mu M$ であった。一方, LV および FL は $2,000 \mu M$ においても約 20% の阻害であった。

Fig. 6 に EN および CP を阻害剤として用いたときの Lineweaver-Burk plot と Dixon plot を示した。Lineweaver-Burk plot において EN および CP 濃度が 0, 200 および $1,000 \mu M$ の 3 本の直線は, いずれの化合物においてもほぼ y 軸上 ($1/v$) で交差した。さらに Dixon plot から算出した EN および CP の K_i 値は, それぞれ $158.5 \pm$

$48.4 \mu M$ および $245.6 \pm 49.8 \mu M$ であった。以上のことから, EN および CP の代謝阻害様式は拮抗阻害であることが示唆された。

考 察

FLU は生体内において, 速やかに活性体である OH-FLU (FLU の 2-OH 体) に代謝される²⁾。この OH-FLU の生成に関与する主なヒト P450 分子種は CYP1A2, 1A1, 2C9 および 2C19 であり, とくに CYP1A2 の特異的阻害剤の 7, 8-benzoflavone により, OH-FLU の生成が 90% 以上阻害されることから, CYP1A2 の寄与率が高いことが示唆された。この結果は, Shet ら¹⁾の報告と一致した。しかし, 3 種のヒト肝ミクロソームを用いた FLU の 2-水酸化活性の Eadie-Hofstee plot において, 1 種のヒト肝ミクロソ

ムのみ二相性を示した。試験に用いたヒト肝ミクロソームの各 P450 分子種の活性値を比較したとき、二相性を示したヒト肝ミクロソームの CYP1A2 の活性は最も低く、CYP2C の活性が最も高かったことから、CYP1A2 だけでなく CYP2C の関与する FLU の 2-水酸化活性が認められ、二相性を示したと考えられる。

一方、ニューキノロン系抗生物質は、テオフィリンに対する阻害の強さにしたがって、I, II, III群の3群に分類される⁹⁾。本試験においてはI群のEN, II群のCP, III群のLVおよびFLを各群から選択した。ヒト肝ミクロソームによるFLUの2-水酸化活性に対する阻害はI群のENが最も強く、次いでII群のCPであった。III群のLVおよびFLについてはほとんど阻害作用は認められず、テオフィリンに対する阻害活性と対応していた。

In vivo での阻害率 (R) は、 K_i 値と血漿中の薬物 (阻害剤) 濃度から、次式により予測できる⁶⁾。

$$R = 1 + [I]/K_i = 1 + f_u \times C_{ss}/K_i$$

[I]: 阻害剤濃度, f_u : 血漿中非結合型分率,
 C_{ss} : 定常状態血漿中薬物濃度

今回の実験で求めた K_i 値と報告されている薬物動態パラメータを用いて、EN ($f_u=0.68^7)$, $C_{ss}=15.6 \mu M^7)$, $K_i=158.5 \mu M$) および CP ($f_u=0.60^8)$, $C_{ss}=3.9 \mu M^8)$, $K_i=245.6 \mu M$) についてヒトでの阻害率を求めると、R はそれぞれ 1.07 および 1.01 であり阻害の程度は小さいと予測される。また、それぞれのニューキノロン系抗生物質が、肝臓において 10 倍に濃縮されたと仮定した場合には、 $R=1.67$ および 1.10 となり、FLU の AUC は EN 併用で約 1.7 倍、CP 併用では約 1.1 倍上昇すると予測される。このことから、EN は併用において FLU の 2-水酸化を軽度 to 阻害することにより、血漿中の FLU 濃度の上昇と OH-FLU 濃度の減少をもたらすなど、代謝的薬物相互作用を引き起こす可能性は否定できない。一方、

FLU の肝に対する副作用については、詳細な発現の作用機序がいまだ解明されておらず、EN との併用が FLU の副作用発現に影響を及ぼすか否かについては不明である。また、これまでに FLU と EN の併用において臨床的に意味のある事象は報告されていない。

今回の試験の結果から、臨床場において使用頻度の高いとされる CP, LV および FL との併用において、FLU の 2-水酸化活性に及ぼす影響は少ないと言える。したがって、FLU とニューキノロン系抗生物質を併用せざるを得ない場合には、CP, LV および FL などのような II, III群に属する薬剤を使用することにより、P 450 に関連した代謝阻害に基づく薬物相互作用の可能性を、最小限に抑えることができると思われる。

文 献

- 1) Shet, M., Mcphaul, M., Fischer, C. W., et al.: Metabolism of the antiandrogenic drug (flutamide) by human CYP1A2. *Drug. Metab. Dispos.*, **25** (11): 1298-1303 (1997).
- 2) 浅川紀子, 山下幸和: 前立腺癌治療薬フルタミドの体内動態. 化学療法の領域, **11**(7): 124-133(1995).
- 3) 黒岩俊介, 柴崎千恵子, 飯塚えりほか: 非ステロイド性抗アンドロゲン剤フルタミドの各種前立腺癌に対する in vitro 及び in vivo 抗腫瘍効果. 基礎と臨床, **29** (4): 887-897 (1995).
- 4) 二本芳人: 阻害剤としてのニューキノロン剤. 月刊薬事, **38** (3): 129-135 (1996).
- 5) Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., et al.: Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270** (1): 414-423 (1994).
- 6) 杉山雄一(編): 医薬品開発における薬物動態研究. 薬業事報社, pp. 213-217.
- 7) 山口俊和, 鈴木玲子, 関根 豊ほか: AT-2266 の体内動態 III ヒトにおける AT-2266 と代謝物の血漿中濃度および尿中排泄. *Chemotherapy*, **32** (S-3): 109-116 (1984).
- 8) Brouwers, J. R. B. J.: Pharmacokinetics of the newer fluoroquinolones. *Pharm. Weekb. Sci.*, **9**: 16-22 (1987).