

博士論文

カクテル試験を用いた薬物相互作用の網羅的解析法の確立と応用

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究科博士論文である

2014 年 1 月

静岡県立大学 薬学部 実践薬学分野

田中 紫茉莉

**Comprehensive and simultaneous evaluation of
drug interactions by cocktail approach**

January 2014

Shimako Tanaka

略語表

本論文中に用いた略号及び略記号は以下の通りである。

AUC : Area under the plasma concentration–time curve

C_{max} : Maximum plasma concentration

CYP : Cytochrome P450

FL : Fluorescence detector

FMO : Flavin-containing monooxygenase

GFJ : Grapefruit juice

HPLC : High performance liquid chromatography

IS : Internal standard

LC-MS/MS : Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LLOQ : Lower limit of quantitation

MAO : Monoamine oxidases

NAT : N-acetyltransferase

OATP : Organic anion transporting polypeptide

QC : Quality control

R² : The correlation coefficient

T_{max} : Time to peak plasma concentration

UGT : UDP-glucuronosyltransferase

目次

緒論	1
第 1 章 カクテル試験における LC-MS/MS による同時定量法の確立	4
第 1 節 緒言	4
第 2 節 実験方法	6
1-2-1. 試薬	6
1-2-2. 基質薬及び代謝物濃度の測定	6
1-2-2-1. 血漿サンプルの前処理方法	6
1-2-2-2. 尿サンプルの前処理方法	6
1-2-2-3. 回収率及びマトリックス効果の評価	6
1-2-2-4. LC-MS/MS 条件	6
1-2-3. 健康成人を対象とした臨床試験	8
1-2-3-1. 対象	8
1-2-3-2. 試験方法	8
第 3 節 実験結果	8
1-3-1. 基質薬及び代謝物濃度の測定	8
1-3-2. 健康成人を対象とした臨床試験への応用	8
第 4 節 考察	14
第 2 章 ラットを用いたカクテル試験による CYP 活性の網羅的解析	16
第 1 節 緒言	16
第 2 節 実験方法	16
2-2-1. 試薬	16
2-2-2. 試験方法	17
2-2-3. 血漿中薬物及び代謝物濃度の測定	17
2-2-4. 薬物動態学的パラメータの算出	18
2-2-5. データ解析	18
第 3 節 実験結果	19
2-3-1. Caffeine 及び paraxanthine の血漿中薬物濃度推移	19
2-3-2. Losartan 及び E3174 の血漿中薬物濃度推移	19
2-3-3. Omeprazole 及び 5-hydroxyomeprazole の血漿中濃度推移	19
2-3-4. Dextromethorphan 及び dextrorphan の血漿中濃度推移	19
2-3-5. Midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の血漿中濃度推移	19
第 4 節 考察	22

第3章	健康成人カクテル試験を用いた rifampicin による CYP 活性変動の網羅的解析	24
第1節	緒言	24
第2節	実験方法	24
3-2-1.	試薬	24
3-2-2.	対象	25
3-2-3.	試験方法	25
3-2-4.	血漿及び尿中薬物及び代謝物濃度の測定	25
3-2-4-1.	サンプル前処理方法	25
3-2-4-2.	LC-MS/MS 条件	25
3-2-5.	データ解析	26
第3節	実験結果	26
3-3-1.	Caffeine 及び paraxanthine の血漿中濃度推移及び CYP1A2 活性評価	26
3-3-2.	Losartan 及び E3174 の血漿中濃度推移及び CYP2C9 活性評価	27
3-3-3.	Omeprazole 及び 5-hydroxyomeprazole の血漿中濃度推移及び CYP2C19 活性評価	27
3-3-4.	Dextromethorphan 及び dextrorphan の血漿中濃度推移及び CYP2D6 活性評価	29
3-3-5.	Midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の血漿中濃度推移及び CYP3A4 活性評価	30
3-3-6.	各基質薬物の CYP 活性指標を用いた活性評価	30
第4節	考察	32
第4章	カクテル試験を用いたグレープフルーツジュースによる CYP 及び有機アニオントランスポーター阻害作用の同時解析	34
第1節	緒言	34
第2節	実験方法	35
4-2-1.	試薬及び飲料	35
4-2-2.	対象	35
4-2-3.	試験方法	35
4-2-4.	血漿中薬物濃度の測定	36
4-2-4-1.	サンプル前処理方法	36
4-2-4-2.	LC-MS/MS 条件	36
4-2-5.	データ解析	36
第3節	実験結果	37
4-3-1.	Celiprolol の血漿中濃度推移	37
4-3-2.	Midazolam の血漿中濃度推移	39
4-3-3.	GFJ 併用による薬効の変動	40

第4節 考察	42
総括	44
謝辞	47
参考文献.....	48

緒論

平成 25 年の日本における 65 歳以上の人口は 3,156 万人であり、4 人に 1 人が高齢者の超高齢社会を迎え、今後さらに高齢化は進んで行くと考えられる。高齢者は複数の疾患を抱えることが多く、その結果多くの薬を併用する。平成 24 年社会医療診療行為別調査結果²⁾によると、院内処方（入院外・投薬）では 1 人 1 日あたり平均 3.66 種類、院外処方（薬局調剤）では 3.87 種類の処方薬を使用している。このように臨床の場では、単一の薬物で治療される場合よりはむしろ多剤が併用されることが多く、薬物相互作用は常に起こりうるものと認識しなければならない^{3,4)}。

一般に薬物相互作用は薬物動態学的相互作用と薬力学的相互作用に大別される⁵⁾。前者は薬物の吸収、分布、代謝、排泄の過程において生じる相互作用であり、薬物あるいは活性代謝物の体内動態が変化することにより引き起こされるものである。後者は薬物同士の薬理作用が重なり合ったり、打ち消しあったりすること、または薬物併用により薬物感受性変化を引き起こすことにより起こる相互作用である。医薬品同士も含めた相互作用を調査した報告によると、すべての相互作用のうち薬物動態学的相互作用は全体の 53%と最も高く、薬力学的相互作用は 35%である。さらに薬物動態学的相互作用のなかで代謝過程におけるものが約 70%に達すると言われており、代謝過程における相互作用の約 96%に薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP) が関与していると推察されている⁶⁻⁹⁾。CYP は臨床的に使用されている多くの薬や生体異物の第 I 相反応である酸化代謝の中心的役割を担うヘムタンパクの集団である。通常、CYP は酸素の活性化に伴う薬の酸化反応を行い、一般的に母化合物よりも極性の高い代謝物を産生する。また酸化反応だけでなく、水酸化やアルキル化、還元、開環反応に関わることも知られている¹⁰⁾。CYP の活性には遺伝子多型や性別、年齢などによる個人差が存在するため、薬物の体内動態を大きく変化させ、安全で効果的な薬物治療を行うことを難しくしている。さらに遺伝子多型や性別といった要因以外にも併用薬により CYP 活性は変動することが知られており、薬物相互作用として様々な報告がある¹¹⁻¹³⁾。CYP には複数の分子種が存在し、アミノ酸配列の一次構造の違いにより分類される。相同性が 40%未満のものを異なるファミリーとし、CYP1、CYP2、CYP3 のように分類し¹⁴⁾、それぞれのファミリーのなかで相同性が 55%未満のものは A、B、C などの異なるサブファミリーに分ける。これらのなかで主に薬物代謝に関わる CYP は CYP1、2、3 である¹⁵⁾。世界的にも使用されている医薬品の代謝に関わる薬物代謝酵素は Fig. 1 に示す通り、医薬品の代謝に CYP が深く関わっていることが窺える⁶⁾。またこれらの CYP で代謝される医薬品のうち約 50%が CYP3A4 で代謝され、2C9、2C19、2D6、1A2 も寄与が大きい。このように CYP には複数の分子種が存在し、各 CYP の肝臓での相対的存在量や薬物代謝へ関与する割合は異なるなどそれぞれの CYP に特徴がある。このため薬物相互作用を予測する上でも CYP 活性を調べることは重要だと考えられる。

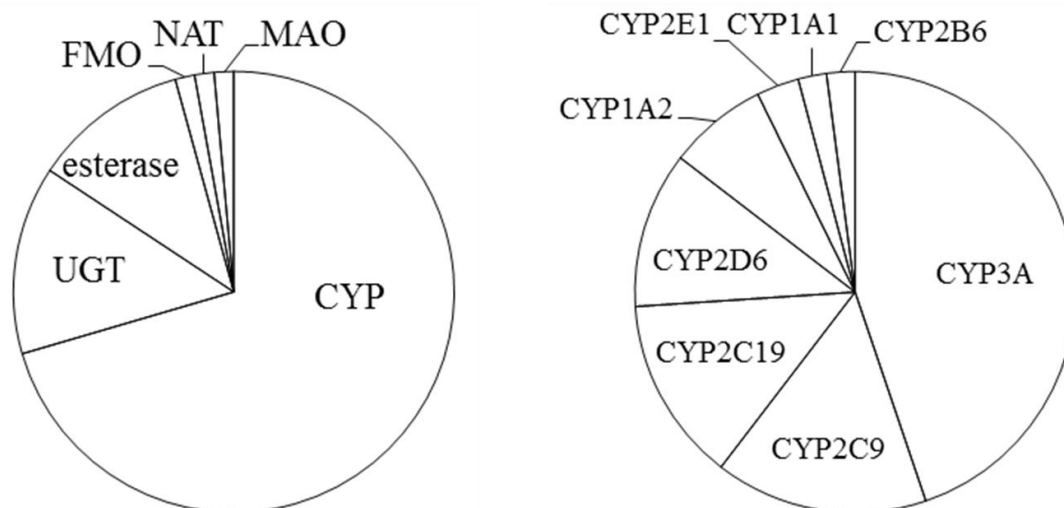


Fig. 1 Clearance mechanisms for the top 200 drugs prescribed in the United States in 2002. Left panel, listed enzymes contributing to clearance for metabolized drugs ; Right panel, proportion of CYP substrates in the top 200 metabolized by each listed member of that subfamily. CYP: cytochrome P450, UGT: UDP-glucuronosyltransferase, FMO: flavin-containing monooxygenase, NAT : N-acetyltransferase, MAO : monoamine oxidases

また、近年では代謝だけでなく吸収過程による薬物相互作用も注目されている。経口投与における薬物の体内動態において薬物の消化管吸収過程が重要であり、特にトランスポーターはその発現や機能に個体差が存在する場合、薬物の吸収性が変動し血中濃度や薬効に影響を与えると考えられる。さらにトランスポーターは医薬品間だけでなく健康食品との併用など多岐にわたる相互作用に関与している可能性がある。有機アニオントランスポーター (organic anion transporting polypeptide, OATP) は多様な薬物を基質として認識し細胞外から細胞内へ輸送する取り込み型トランスポーターである。OATP は消化管、肝臓、腎臓、脳など様々な組織に発現し、生理活性物質や薬物の体内動態に関与している。特に消化管上皮細胞に発現する OATP は薬物の吸収に関与している¹⁶⁻¹⁸⁾。また OATP には多数のサブタイプが存在しており、消化管上皮細胞に発現する OATP としては OATP1A2, OATP2B1, OATP3A1, OATP4A1, OATP1C1, 及び OATP4C1 が報告されている。中でも OATP1A2 及び OATP2B1 が主に消化管での基質の取り込みに関与している¹⁹⁻²¹⁾。

このように CYP やトランスポーター活性は多様であり、さらに併用薬や食品などによっても大きく変動する。そのためこれらの活性を評価することは患者ごとに最適な薬物治療を行う上で有用な情報を与えられると考えられる。これまでに非臨床試験あるいは臨床試験により、CYP やトランスポーター活性評価が行われてきた。一般に活性評価は肝ミクロソームやヒト組織などを用いた *in vitro* や実験動物で行われているが、種差や体内動態など様々な要因により、これらの結果がヒトで評価した結果と同じであるとは限らない。このためヒトを対象とした臨床試験による評価が不可欠である。しかし、頻回の採血を必要とし、被験者の負担が大きくなるため、被験者数を増やすことが難しいというデメリットがあり、膨大な組み合わせがある薬物相互作用のすべてを臨床試験で検討するのは現実的ではないため、効率的かつ網羅的な評価法が望まれている。

Table 1 CYP probe drugs of previous cocktail approach.

Cocktail name	CYP probe drugs	References
Cooperstown	CYP1A2 (caffeine), CYP2C19 (omeprazole), CYP2D6 (dextromethorphan), CYP3A4 (midazolam)	Streetman <i>et. al.</i> (2000) ²²⁾
Cooperstown 5+1	CYP1A2 (caffeine), CYP2C9 (warfarin+vitamin K), CYP2C19 (omeprazole), CYP2D6 (dextromethorphan), CYP3A4 (midazolam, <i>i.v.</i>)	Chainuvati <i>et. al.</i> (2003) ²³⁾
Karolinska	CYP1A2 (caffeine), CYP2C9 (losartan), CYP2C19 (omeprazole), CYP2D6 (debrisoquin), CYP3A4 (quinine)	Christensen <i>et. al.</i> (2003) ²⁴⁾
Inje	CYP1A2 (caffeine), CYP2C9 (losartan), CYP2C19 (omeprazole), CYP2D6 (dextromethorphan), CYP3A4 (midazolam)	Ryu <i>et. al.</i> (2007) ²⁵⁾

カクテル試験は、代謝酵素やトランスポーターの複数の基質薬を混合した「カクテル薬」を被験者に投与し、その薬物動態を検討することにより一度に複数の CYP 及びトランスポーター活性を評価できる試験法である。今までに "Cooperstown cocktail"、"Cooperstown 5+1 cocktail" や "Karolinska cocktail" などのように基質薬の種類や組み合わせを変化させ、様々なカクテル薬が考案され、CYP 活性評価が試みられてきた (Table 1)²²⁻²⁵⁾。

しかし既報のカクテル試験では各基質薬ごとに異なる定量法が用いられ、同時定量法は確立されていない。また、カクテル試験を実験動物に応用した報告はほとんどない。加えて、カクテル試験を用いて実際に併用薬や食品との薬物相互作用を解析した報告はわずかであり、基質薬も CYP 分子種のみを対象としておりトランスポーター活性も同時評価した例は少ない。

そこで本研究では、これらの課題を克服しカクテル試験を用いた薬物相互作用の網羅的解析法を確立し、応用することを目的とした。本論文では既報のカクテル試験の中で、基質薬が国内で臨床使用されており、被験者に対する侵襲性が低く、安価であるという利点を持つ、Inje cocktail を選択して研究を行った。

第 1 章では、カクテル薬及びその主代謝物の同時定量法を構築した。ヒトにおける 5 種の主要な CYP 分子種の基質薬及びそれぞれの代謝物の計 10 種化合物の単一の前処理法による同時定量法を検討した。また、健康成人 4 名を対象にカクテル試験を行い、CYP 活性の評価が可能であるか検討した。第 2 章では、ラットを対象としたカクテル試験を行い、カクテル試験が実験動物にも応用可能か検討を行った。第 3 章では、健康成人を対象としたカクテル試験を行い、CYP 誘導薬である rifampicin による CYP 活性の変動を経時的に評価した。そして第 4 章では、カクテル試験を用いて CYP 及びトランスポーター活性を同時評価した。すなわち、CYP と OATP を介する相互作用の同時検出を目的としてカクテル試験を行い、グレープフルーツジュース (GFJ) によるそれらの阻害作用の持続時間を比較検討した。

第 1 章 カクテル試験における LC-MS/MS による同時定量法の確立

第 1 節 緒言

カクテル試験は一度に複数の CYP 活性を評価でき、薬物相互作用を検討するための方法である。今までに"Cooperstown 5+1 cocktail"や"Cooperstown cocktail"、"Karolinska cocktail"などのように基質薬の種類や組み合わせを変化させ、様々なカクテル薬が考案され、CYP 活性評価が試みられてきた²²⁻²⁵⁾。

しかし、これまでカクテル試験においては多くの場合、各 CYP の基質薬ごと別々の方法で試料の処理を行い、血漿中薬物濃度や尿中薬物濃度の解析をしている²²⁻²⁵⁾。カクテル試験は 1 つの薬物の体内動態を評価するには被験者から経時的に採血、または蓄尿を行い、血漿中あるいは尿中の薬物濃度を測定する必要がある。例えば、"Inje cocktail"ではカクテル薬に caffeine、losartan、omeprazole、dextromethorphan、midazolam の 5 種を使用している (Fig. 2)。Caffeine と omeprazole は血漿試料を同時に溶媒抽出により処理を行い、基質薬及び代謝物を LC-MS/MS で定量を行っている。Losartan は蓄尿をし、固相抽出により処理した基質薬及び代謝物を HPLC- fluorescence detector (FL)で、dextromethorphan は蓄尿をした試料を溶媒抽出で処理を行い、基質薬及び代謝物を HPLC-FL で定量している。また、midazolam は血漿試料を caffeine、omeprazole とは異なる方法で溶媒抽出を行い、LC-MS/MS で定量を行っている²⁵⁾。これらの前処理及び測定は必ずしも簡便とは言えない。

本章では、カクテル試験を簡便な方法かつ迅速に行うために、"Inje cocktail"で使用されている、ヒトの主要な代謝酵素である 5 種類の CYP 分子種 (CYP1A2、2C9、2C19、2D6 及び 3A4) の各基質薬とそれらの主代謝物の単一前処理法による同時定量法の確立を目的として研究を行った。

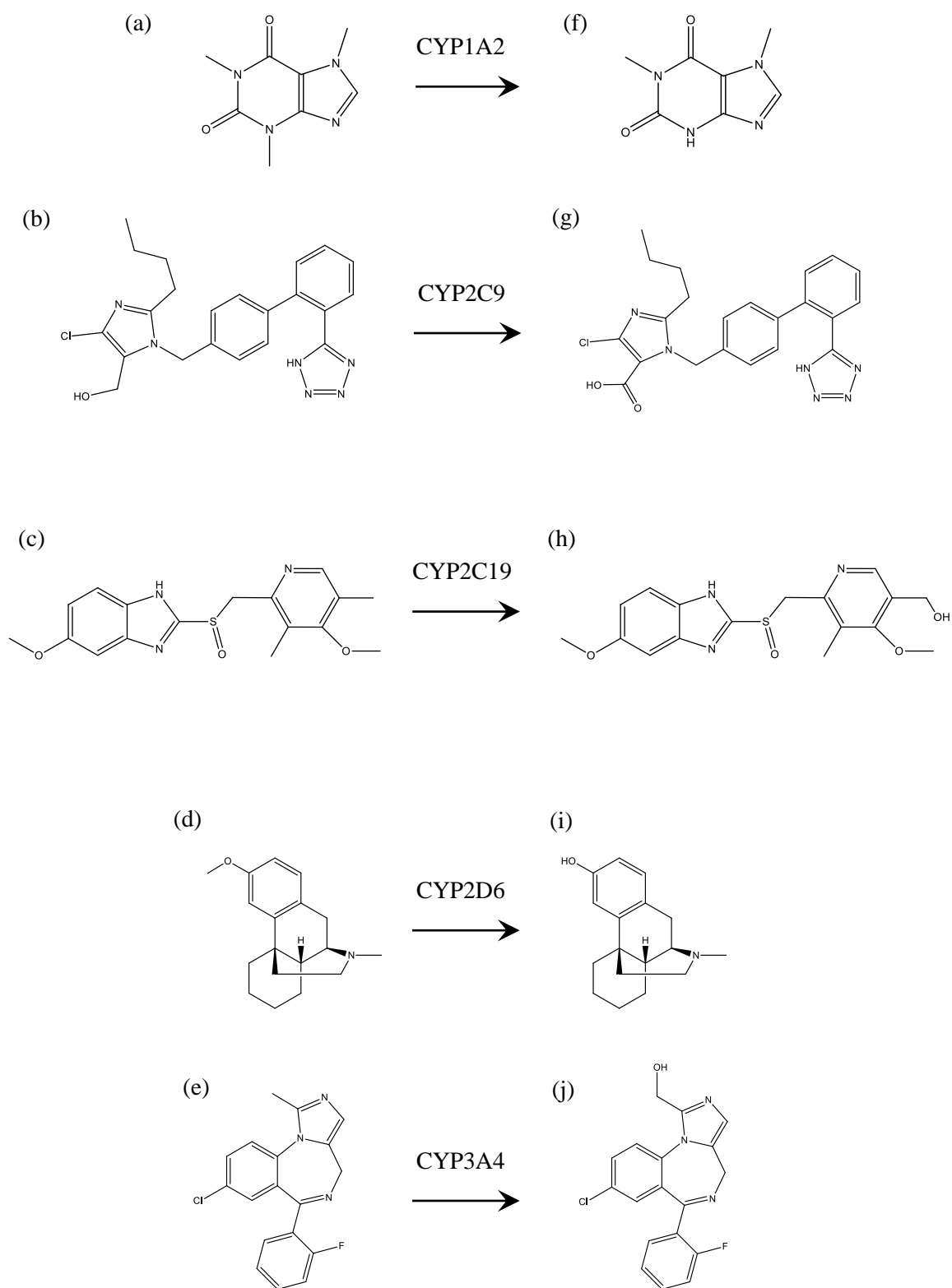


Fig. 2 Structures of the CYP probe drugs and their metabolites.

(a): caffeine, (b): losartan, (c): omeprazole, (d): dextromethorphan, and (e): midazolam, (f): paraxanthine, (g): losartan carboxylic acid (E3174), (h): 5-hydroxyomeprazole, (i): dextrorphan, (j): 1'-hydroxymidazolam.

第2節 実験方法

1-2-1. 試薬

Caffeine、losartan、omeprazole、dextromethorphan、midazolam、dextrorphan、1'-hydroxymidazolam 及び nitrazepam は Sigma-Aldrich Co. LLC. (St. Louis, MO, USA) から、paraxanthine、E3174、5-hydroxy omeprazole 及び β -glucuronidase は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。臨床試験に使用したカフェイン「ホエイ」はマイラン製薬 (東京)、ニューロタン錠は MSD (東京)、オメプラール錠はアストラゼネカ (大阪)、メジコン錠はシオノギ製薬 (大阪)、ドルミカム注はアステラス製薬 (東京) から購入した。その他の試薬は全て市販の特級規格品を使用した。

1-2-2. 基質薬及び代謝物濃度の測定

1-2-2-1. 血漿サンプルの前処理方法

血漿サンプル 0.3 mL に内部標準物質として nitrazepam (10 ng) を添加し、acetonitrile 900 μ L を加え、固相抽出 (Ostro™ 96-Well Plate, Waters, Milford, MA, USA) を行った。抽出液を窒素気流下で蒸発乾固し、残渣を methanol 300 μ L で再構築し、再度窒素気流下で乾固した。Methanol 100 μ L で再構築した。再溶解液をマイクロフィルター (Millex-LG, 0.20 μ m, EMD Millipore, Billerica, MA, USA) で濾過し、10 μ L を LC-MS/MS 用試料とした。

1-2-2-2. 尿サンプルの前処理方法

尿サンプル 0.1 mL に β -glucuronidase (500 U) の 50 mM sodium acetate 溶液 (pH 5.0) 1 mL を添加し、37 °C で 24 時間インキュベートした。インキュベートした尿サンプル 0.3 mL に内部標準物質として nitrazepam (10 ng) を添加し、acetonitrile 900 μ L を加え固相抽出 (Ostro™ 96-Well Plate) を行った。抽出液をマイクロフィルター (Millex-LG, 0.20 μ m) で濾過し、10 μ L を LC-MS/MS 用試料とした。

1-2-2-3. 回収率及びマトリックス効果の評価

回収率及びマトリックス効果の評価は、血漿及び尿の Quality control (QC) サンプルを用いて 2 濃度 (低濃度及び中濃度) で行った。QC サンプル濃度は、caffeine 及び paraxanthine (血漿及び尿; 10, 1000 ng/mL)、losartan (血漿; 1, 100 ng/mL、尿; 10, 1000 ng/mL)、E3174 (血漿; 1, 100 ng/mL、尿; 10, 1000 ng/mL)、omeprazole (血漿; 1, 100 ng/mL)、5-hydroxyomeprazole (血漿; 1, 100 ng/mL)、dextromethorphan (血漿; 0.2, 10 ng/mL、尿; 0.1, 10 ng/mL)、dextrorphan (血漿; 0.1, 10 ng/mL、尿; 10, 1000 ng/mL)、midazolam (血漿及び尿; 0.1, 10 ng/mL)、1'-hydroxymidazolam (血漿; 0.1, 10 ng/mL、尿; 1, 100 ng/mL) とした。回収率は QC サンプルと添加サンプルのピークエリア比で算出した。マトリックス効果は、添加サンプルと抽出サンプルのピークエリア比で算出した²⁶⁾。

1-2-2-4. LC-MS/MS 条件

HPLC は 1100 LC system (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) を使用した。分離カラムは CAPCELL PAK C18 MGIII (150 mm \times 2 mm; id, 5 μ m、資生堂、東京) を使用し、プレカラ

ムは CAPCELL PACK C18 MGIII S-5 (10 mm × 2 mm; id, 5 μm、資生堂、東京)を使用した。カラム温度は 40 °Cとした。移動相は 10 mM ammonium acetate (A)及び acetonitrile (B)を用い、流速は 0.2 mL/min、測定時間を 12 分とした。測定 0-6 分は A: B (77.5 : 22.5)、6-12 分は A : B (1 : 9)とした。

質量分析器は API 3000 systems (Applied Biosystems, Forester City, CA. USA) を使用した。標的化合物は Electro Spray Ionization 法により陽イオン化させ、各化合物の transition (m/z) 及びパラメータを設定した (Table 2)。すべての操作及びデータ解析は、Analyst software (version 1.4.1, AB SCIEX, Framingham, MA, USA) を用いて行った。検量線は Table 3 で示した濃度を用いて作成し、 $1/x^2$ で補正した。

Table 2 Analytical parameters for LC-MS/MS.

CYP probe drugs /metabolite	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	DP (V)	CE (eV)	CXP(V)
CYP1A2						
Caffeine	+	195	138	60	30	8
Paraxanthine	+	181	124	60	30	8
CYP2C9						
Losartan	+	423	207	60	22	8
E3174	+	437	235	60	16	8
CYP2C19						
Omeprazole	+	346	198	60	10	8
5-hydroxyomeprazole	+	362	214	60	12	8
CYP2D6						
Dextromethorphan	+	272	171	60	38	8
Dextrorphan	+	258	199	60	26	8
CYP3A4						
Midazolam	+	326	291	60	24	8
1'-hydroxymidazolam	+	342	324	60	20	8
Internal standard						
Nitrazepam	+	282	236	60	52	8

DP, Declustering potential; CE, Collision energy; CXP, Collision cell exit potential.

1-2-3. 健康成人を対象とした臨床試験

1-2-3-1. 対象

被験者は健康成人男性 4 名で、年齢 36.0 ± 3.4 歳、体重 81.5 ± 13.1 kg (平均 \pm 標準偏差) であった。被験者は本試験の目的、方法、予測される効果、自由意思による試験への参加及び同意撤回の任意性などについて十分に説明を受け、文書にて試験への参加に同意した。また試験 3 日前より、caffeine を含有する飲料の摂取を禁止した。本試験計画書は浜松医科大学及び静岡県立大学倫理委員会において承認され、ヘルシンキ宣言を遵守して実施した。

1-2-3-2. 試験方法

被験者は カフェイン「ホエイ」(caffeine, 100 mg)、ニューロタン錠 (losartan, 50 mg)、オメプラール錠 (omeprazole, 20 mg)、メジコン錠 (dextromethorphan, 30 mg)、ドルミカム注 (midazolam, 15 μ g/kg) をカクテル薬として同時に服用した。薬物投与前、投与後 0.5、1、1.5、2、3、4、6 及び 8 時間に採血を行った。1 回採血量は 7 mL とし、血液より血漿サンプルを分離し -80°C で保存した。また薬物直前から投与後 8 時間まで蓄尿を行い、 -80°C で保存した。前項で記した方法を用いて、血漿中及び尿中の薬物濃度及び主代謝物濃度を測定した。

第 3 節 実験結果

1-3-1. 基質薬及び代謝物濃度の測定

血漿及び尿中の 5 種薬物とそれらの代謝物のピークは、4.4 分から 11.7 分の間に検出された (Fig. 3)。血漿中及び尿中薬物濃度の検量線は、Table 3 に示した定量範囲でいずれも良好な直線性を示した ($R^2 > 0.946$)。定量における相対誤差及び変動係数は、全ての化合物において血漿サンプルでいずれも 15% 以下、尿サンプルで 15% 及び 16% 以下であった (Table 4 及び Table 5)。血漿及び尿サンプルにおける回収率は 66.4% 及び 77.5% 以上であった。マトリックス効果は、血漿サンプルにおいて 89.6%–115%、尿サンプルにおいて 86.0%–116% であり、測定上問題となる著しいマトリックス効果は認められなかった²⁶⁾。

1-3-2. 健康成人を対象とした臨床試験への応用

カクテル薬投与 8 時間後までの血漿中濃度推移が得られ、同時に複数の CYP 活性を評価することが可能であった (Fig. 4)。また、カクテル薬投与 8 時間後における基質薬及びその代謝物の血漿中薬物濃度は、いずれも本研究のカクテル試験における定量限界以上であった。また、カクテル薬投与後の基質薬及びその代謝物の尿中排泄量を定量することが可能であった (Table 6)。

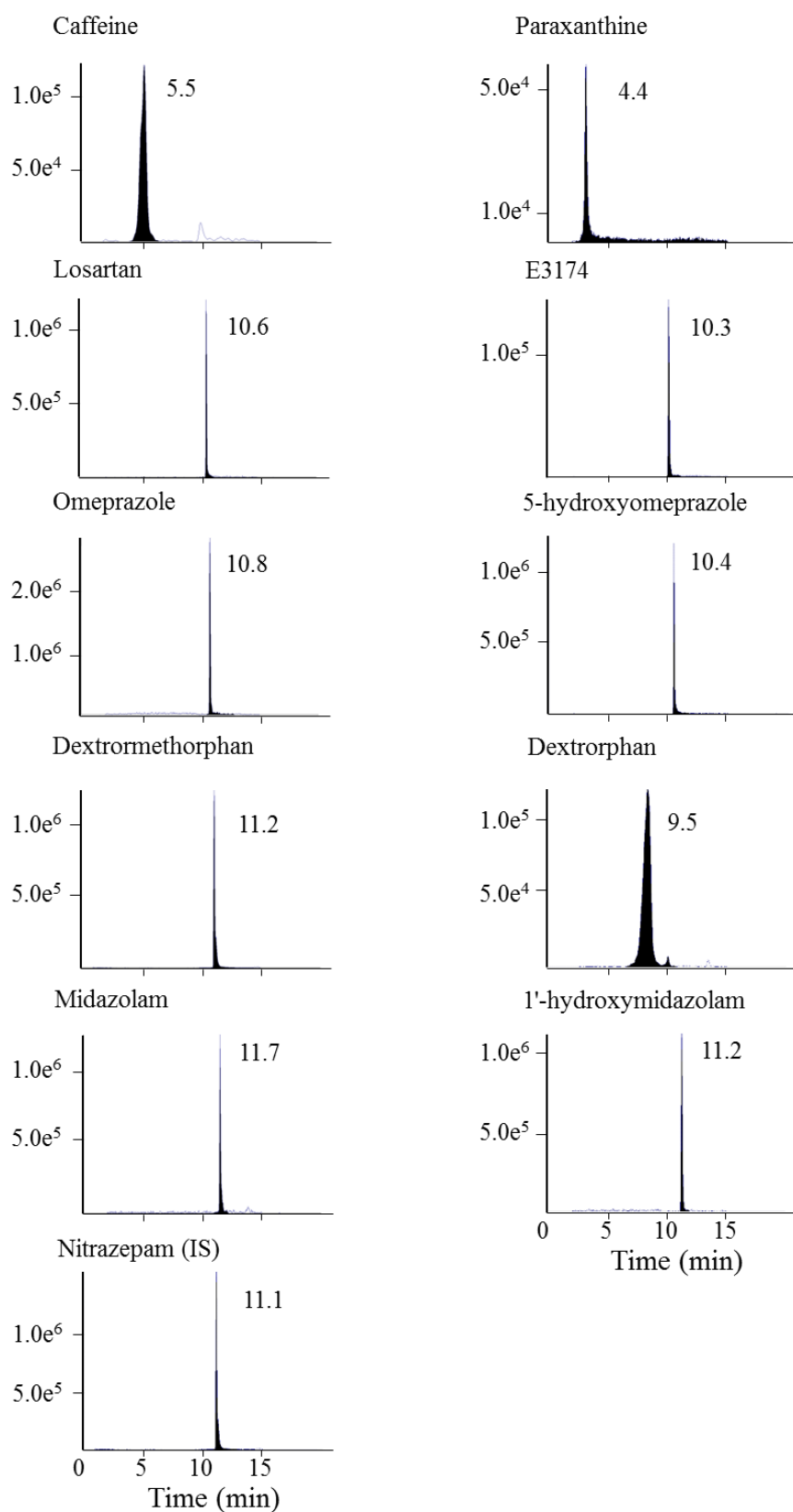


Fig. 3 LC-MS/MS chromatograms of CYP probe drugs and their metabolites, present at a concentration of 100 ng/mL in human plasma.

Table 3 Calibration curves, linearity, and sensitivity of the assay in human plasma and urine.

CYP probe drugs /metabolite	Retention time (min)	Calibration range (ng/mL)	Correlation coefficients (R ²)	LLOQ (ng/mL)
Plasma				
Caffeine	5.5	10–10000	0.988 ± 0.017	10
Paraxanthine	4.4	10–10000	0.946 ± 0.043	10
Losartan	10.6	1–1000	0.988 ± 0.014	1
E3174	10.3	1–1000	0.968 ± 0.018	1
Omeprazole	10.8	1–1000	0.990 ± 0.010	1
5-hydroxyomeprazole	10.4	1–1000	0.980 ± 0.014	1
Dextromethorphan	11.2	0.2–100	0.981 ± 0.009	0.2
Dextrorphan	9.5	0.1–100	0.975 ± 0.013	0.1
Midazolam	11.7	0.1–100	0.980 ± 0.024	0.1
1'-hydroxymidazolam	11.2	0.1–100	0.986 ± 0.011	0.1
Urine				
Caffeine	5.5	10–10000	0.963 ± 0.027	10
Paraxanthine	4.4	10–10000	0.990 ± 0.012	10
Losartan	10.6	10–10000	0.986 ± 0.012	10
E3174	10.3	10–10000	0.983 ± 0.022	10
Dextromethorphan	11.2	0.1–100	0.974 ± 0.003	0.1
Dextrorphan	9.5	10–10000	0.988 ± 0.009	10
Midazolam	11.7	0.1–100	0.992 ± 0.003	0.1
1'-hydroxymidazolam	11.2	1–1000	0.988 ± 0.011	1

Correlation coefficients represent as mean ± SD.

LLOQ, lower limit of quantitation.

Calibration curves were generated using 6 different concentrations of each drug and metabolite within the calibration range, and the data were analyzed by weighted linear regression (weighting factor, 1/x²). LLOQ defined by the lowest concentration within the linear range of the calibration curves that gives an acceptable accuracy from 80% to 120% and a precision of < 20% ²⁷⁾.

Table 4 Precision, accuracy, recovery and matrix effect in the quality control sample of plasma.

CYP probe drugs /metabolite	Nominal concentration (ng/mL)	Measured concentration (ng/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)	Recovery (%)	Matrix effect (%)
Caffeine	10	9.92 ± 0.08	0.9	99.2	102	94.7
	100	108 ± 8.56	7.9	108	-	-
	1000	911 ± 46.1	5.1	91.1	94.1	105
	10000	9130 ± 766	8.4	91.3	-	-
Paraxanthine	10	10.4 ± 0.99	9.5	104	86.8	102
	100	112 ± 10.5	9.4	112	-	-
	1000	995 ± 133	13.4	99.5	83.4	95.3
	10000	10100 ± 1315	13.1	101	-	-
Losartan	1	0.98 ± 0.02	2.2	97.8	100	96.2
	10	10.3 ± 0.49	4.7	103	-	-
	100	99.8 ± 9.19	9.2	99.8	102	97.5
	1000	920 ± 59.3	6.4	92.0	-	-
E3174	1	1.00 ± 0.06	6.1	100	80.0	115
	10	8.83 ± 1.03	11.7	88.3	-	-
	100	90.6 ± 11.7	12.9	90.6	72.3	113
	1000	1150 ± 31.1	2.7	115	-	-
Omeprazole	1	0.98 ± 0.04	3.7	98.3	104	90.9
	10	9.73 ± 0.43	4.4	97.3	-	-
	100	99.1 ± 8.27	8.4	99.1	103	95.2
	1000	914 ± 104	11.4	91.4	-	-
5-hydroxyomeprazole	1	1.02 ± 0.03	3.4	102	95.1	93.9
	10	9.59 ± 0.76	7.9	95.9	-	-
	100	88.6 ± 5.74	6.5	88.6	109	96.8
	1000	1100 ± 29.6	2.7	110	-	-
Dextromethorphan	0.2	0.20 ± 0.004	1.8	100	97.4	108
	2	1.73 ± 0.26	15.0	86.5	-	-
	10	10.8 ± 1.06	9.8	108	105	93.3
	100	9.67 ± 6.26	6.5	96.7	-	-
Dextrorphan	0.1	0.10 ± 0.001	1.0	100	66.4	94.8
	1	1.04 ± 0.14	13.4	104	-	-
	10	10.1 ± 0.59	5.9	101	67.1	94.5
	100	106 ± 9.07	8.6	106	-	-
Midazolam	0.1	0.11 ± 0.01	7.5	107	106	89.6
	5	5.18 ± 0.60	11.6	104	-	-
	10	10.1 ± 0.39	3.9	101	112	96.2
	100	93.8 ± 3.37	3.6	93.8	-	-
1'-hydroxymidazolam	0.1	0.11 ± 0.01	9.6	111	106	106
	2	1.99 ± 0.23	11.4	99.3	-	-
	10	10.6 ± 0.67	6.4	106	102	107
	100	90.3 ± 7.67	8.5	90.3	-	-

Each value represents as mean ± SD. The interday accuracy and precision were assessed by each QC samples with 5 different determinations on 3 different days. The recovery and the matrix effect were assessed for QC samples at 2 different concentrations (low and middle).

Table 5 Precision, accuracy, recovery and matrix effect in the quality control sample of urine.

CYP probe drugs /metabolite	Nominal concentration (ng/mL)	Measured concentration (ng/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)	Recovery (%)	Matrix effect (%)
Caffeine	10	9.84 ± 0.15	1.4	98.4	110	97.4
	100	108 ± 2.26	2.1	108	-	-
	1000	1110 ± 57.3	5.2	111	79.6	80.6
	10000	8740 ± 1270	14.6	87.4	-	-
Paraxanthine	10	10.1 ± 0.48	4.8	101	91.3	106
	100	107 ± 14.5	13.6	107	-	-
	1000	946 ± 47.3	5.0	94.6	116	110
	10000	10200 ± 1070	10.5	102	-	-
Losartan	10	9.78 ± 0.15	1.5	97.8	97.0	100
	100	115 ± 11.8	10.3	115	-	-
	1000	939 ± 53.7	5.7	93.9	85.0	94.0
	10000	8710 ± 270	3.1	87.1	-	-
E3174	10	9.92 ± 0.23	2.3	99.2	76.2	87.9
	100	106 ± 15.9	15.0	106	-	-
	1000	948 ± 64.2	6.8	94.8	97.4	86.0
	10000	9620 ± 1180	12.2	96.2	-	-
Dextromethorphan	0.1	0.10 ± 0.001	1.1	101	85.0	98.6
	1	1.12 ± 0.05	4.3	112	-	-
	10	10.6 ± 0.74	7.0	106	103	92.0
	100	84.4 ± 10.5	12.4	84.4	-	-
Dextrorphan	10	9.89 ± 0.05	0.5	98.9	88.1	112
	100	104 ± 6.46	6.2	104	-	-
	1000	1090 ± 60.8	5.6	109	96.7	116
	10000	8720 ± 500	5.7	87.2	-	-
Midazolam	0.1	0.10 ± 0.001	1.2	101	95.2	97.8
	1	0.97 ± 0.06	5.9	96.6	-	-
	10	9.43 ± 0.75	7.9	94.3	77.5	94.5
	100	107 ± 2.33	2.2	107	-	-
1'-hydroxymidazolam	1	1.01 ± 0.03	2.6	101	99.6	90.9
	10	10.7 ± 1.32	12.4	107	-	-
	100	95.5 ± 6.25	6.5	95.5	97.7	94.4
	1000	1060 ± 115	10.9	106	-	-

Each value represents as mean ± SD. The interday accuracy and precision were assessed by each QC samples with 5 different determinations on 3 different days. The recovery and the matrix effect were assessed for QC samples at 2 different concentrations (low and middle).

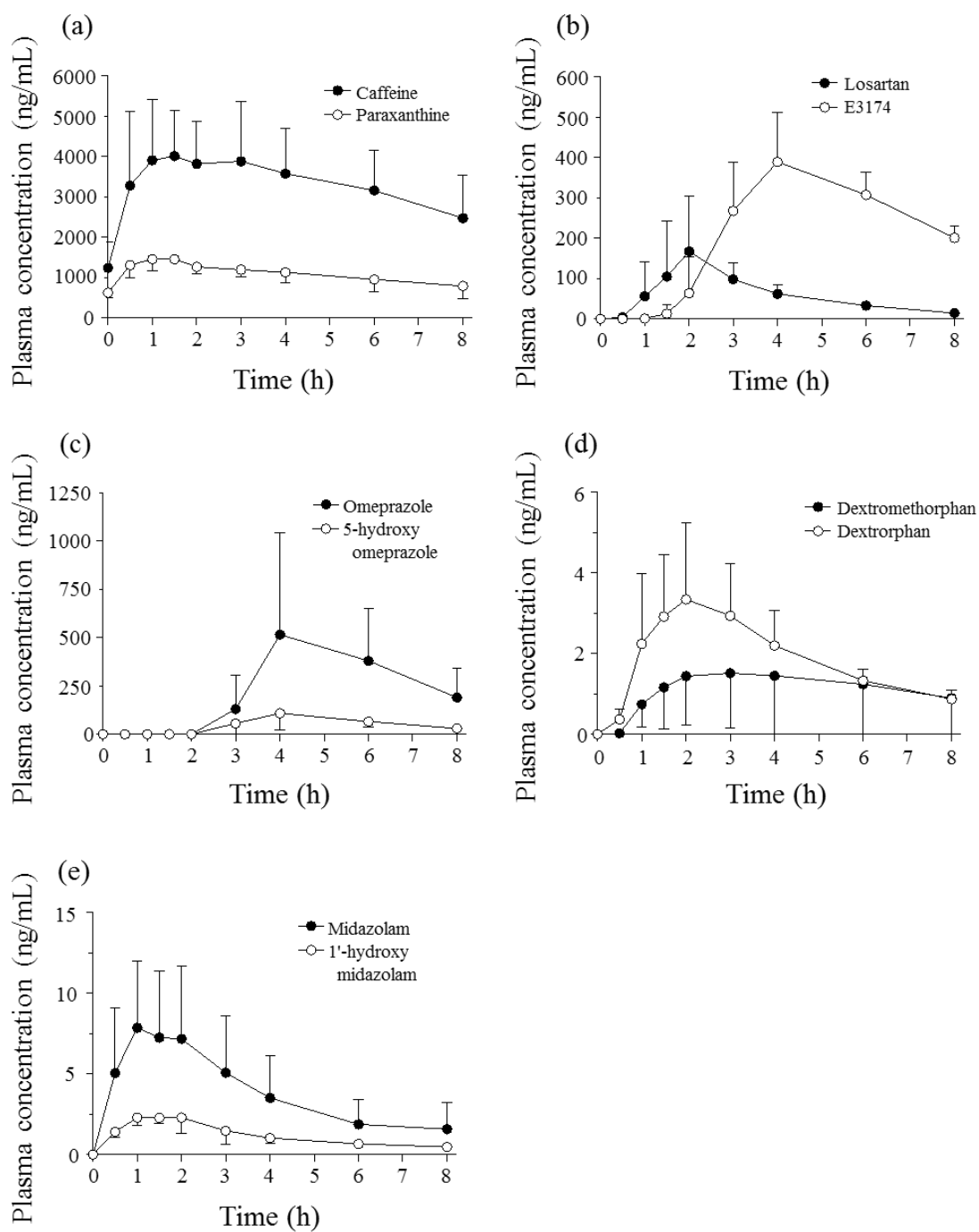


Fig. 4 Time course of plasma concentrations of CYP probe drugs and their metabolites, following oral administration to 4 healthy volunteers. Each point represents the mean \pm SD.

(a): caffeine and paraxanthine, (b): losartan and E3174, (c): omeprazole and 5-hydroxyomeprazole, (d): dextromethorphan and dextrophan, (e): midazolam and 1'-hydroxymidazolam.

Table 6 Amount of excretion of CYP probe drugs and their metabolites and the 8 h urinary metabolic ratio in 4 healthy volunteers.

CYP probe drugs /metabolite	Amount of excretion (μg)		Urinary metabolic ratio
	Probe drugs	Metabolite	
Caffeine/paraxanthine	653 ± 322	3290 ± 2490	0.391 ± 0.520
Losartan/E3174	588 ± 291	901 ± 633	0.614 ± 0.362
Dextromethorphan/dextrorphan	20.2 ± 30.6	3240 ± 1980	0.00808 ± 0.0127
Midazolam/1'-hydroxymidazolam	2.38 ± 2.19	385 ± 265	0.00778 ± 0.00389

Values are presented as the mean ± SD.

第4節 考察

CYPには様々な分子種が存在し、年齢や遺伝子多型などによりその活性には大きな個人差がある。また併用薬による酵素誘導や阻害によりCYP活性は変化する。このCYP活性を評価するために一度に複数のCYP活性を評価できるカクテル試験が新たな薬物相互作用の検出法として期待される。しかし、カクテル薬及びそれぞれの代謝物の血漿中あるいは尿中の薬物濃度を測定する必要があるため、必ずしも効率的にCYP活性評価が行えるとは限らない。そのため本章では、カクテル試験を簡便かつ迅速に行えるようにするため、血漿中及び尿中薬物とそれらの代謝物の単一前処理による同時定量法の確立を試みた。

カクテル薬は、"Inje cocktail"²⁵⁾と同じく、CYP1A2の基質薬にcaffeine、CYP2C9の基質薬にlosartan、CYP2C19の基質薬にomeprazole、CYP2D6の基質薬にdextromethorphan、CYP3A4の基質薬にmidazolamを選択した。さらにそれぞれの基質薬の代謝物であるparaxanthine、E3174、5-hydroxyomeprazole、dextrorphan、1'-hydroxymidazolamの計10種化合物の同時定量法の確立を試みた。

これまでに報告されたカクテル試験では、基質薬ごとに複数の前処理及び測定が必要であった。一方、本法では、単一の前処理でマトリックス効果の主な原因となるリン脂質を除去可能であるOstro 96-Well Plateを使用し、血漿及び尿検体の前処理を行った²⁸⁾。Ostroの標準プロトコールでは酸性acetonitrileを抽出に用いるが、CYP2C19基質のomeprazoleが酸性条件下で不安定なため、中性acetonitrileを用いて抽出操作を行った。また、尿検体は酸性条件下で24時間β-glucuronidase処理を行う必要があったため、omeprazole及び5-hydroxyomeprazoleは定量不可能であった。

前処理後の血漿及び尿サンプル中のLC-MS/MSにおける基質薬及びそれらの代謝物のピークは4.4分から11.7分に検出され、1サンプルあたり12分で測定可能であった。血漿サンプルにおける検量線は、caffeine及びparaxanthineは10–10000 ng/mL、losartan、E3174、omeprazole及び5-hydroxyomeprazoleは1–1000 ng/mL、dextromethorphanは0.2–100 ng/mL、dextrorphan、midazolam及び1'-hydroxymidazolamは0.1–100 ng/mLの範囲で良好な直線性を示した。定量における相対誤差及び変動係数は血漿サンプルでいずれも15%、尿サンプルで16%及び15%以

下であり、良好な信頼性と再現性が得られた²⁷⁾。低濃度及び中濃度領域における回収率は、全ての化合物において血漿及び尿サンプルでそれぞれ 66% 及び 76% 以上であった (Table 4 及び Table 5)。また、マトリックス効果は、血漿サンプルで 89.6% から 115%、尿サンプルで 86.0% から 116% であり、測定上問題となる著しいマトリックス効果は認められなかった²⁶⁾。よって、単一の前処理、かつ 1 測定 12 分という短時間で 5 種の基質薬及び主代謝物の同時定量が可能となった。

次に、この方法を用いて健康成人 4 名を対象にカクテル試験を行い、CYP 活性の評価が可能か検討した。カクテル薬を経口投与し、投与 8 時間後まで経時的に採血及び蓄尿を行った。各基質薬と主代謝物の血漿及び尿中濃度を測定した結果、全ての基質薬及び代謝物の血漿中濃度推移が得られた。したがって、カクテル試験において、本法により全ての基質薬の薬物動態が解析でき、CYP 活性の評価が可能であると考えられた。本章で行った定量では、midazolam のみ治療用量の 1/10、他の基質薬は治療用量を投与している²⁹⁾。しかし、カクテル薬投与 8 時間後の血漿中薬物濃度は全ての基質薬及び代謝物において定量限界以上であったため (Fig. 4)、本試験で用いたカクテル薬は減量可能であると考えられる。カクテル薬を低用量とすることで、臨床試験時に被験者に副作用が発現する危険性を減らせると期待できる。ごく最近の "Inje cocktail" で使用したカクテル薬を用いて同時定量を行った報告では、治療用量の 1/10 から 1/100 という低用量の基質薬を投与しているが、複数の手順の前処理を必要としており、尿の検討は行っていない³⁰⁾。しかし、CYP2C9 及び CYP2D6 活性評価には、多くの報告では losartan 及び dextromethorphan の尿中薬物濃度及び代謝比が用いられている²⁵⁾。一方、本章では血漿に加え、カクテル薬投与後の尿中薬物濃度 (caffeine, losartan, dextromethorphan, midazolam) 及びそれらの代謝物の同時定量法も確立した。

本章の結果、迅速かつ簡便にカクテル試験を実施することが可能となった。本法によりカクテル薬投与後、同時に複数の CYP 活性を評価することができるようになった。

第2章 ラットを用いたカクテル試験による CYP 活性の網羅的解析

第1節 緒言

緒論で述べたように CYP には様々な分子種が存在し、その活性には併用薬による酵素の誘導や阻害が関与している⁸⁹⁾。これまでに CYP 活性を評価することによる薬物相互作用に関する研究は、肝臓のミクロソームなどを用いた *in vitro* 試験や実験動物を用いて体内動態を検討する動物試験、健康成人あるいは患者に実際に薬を投与して体内動態を検討する臨床試験などさまざまな手法で行われてきた³¹⁻³⁵⁾。さらに近年では *in vitro* 試験の結果を基にしてヒトでの結果を予測する、モデリング&シミュレーションの手法も行われている³⁶⁻³⁷⁾。これらの研究のうち、臨床試験による評価は種差の問題が無く試験結果を直接ヒトへと還元できるためインパクトが強い。しかし、頻回の採血を必要とし、被験者の負担が大きくなるため、被験者数を増やすことが難しいというデメリットがあり、膨大な組み合わせがある薬物相互作用のすべてを臨床試験で検討するのは現実的ではない。一方で、*in vitro* 試験や動物実験では試験数を増やすことは容易であるが、スケールアップする際 *in vivo* やヒトの結果を反映しないことがある。このため *in vitro* 試験や動物実験、臨床試験など、それぞれの試験の特徴を理解して使い分ける必要がある。そしてヒトにおける薬物相互作用の影響を良好に反映する動物実験あるいは *in vitro* 試験などによる評価法が求められる。

そこで前章で述べたように、様々なカクテル試験が考案されてきた²²⁻²⁵⁾。これにより、複数の CYP 活性を一度に評価することができると期待される。しかしながら、これまでのカクテル試験はヒトを対象としており、実験動物に応用した報告はほとんどない。

そこで本章では、実験動物として汎用されるラットを用いたカクテル試験の確立を目的として、“Inje cocktail”の基質薬を用いてカクテル試験を行い、種々の CYP 誘導薬及び阻害薬が CYP 活性に対して与える影響について検討した。

第2節 実験方法

2-2-1. 試薬

Fluconazole は LTK Laboratories, Inc. (St Paul, MN, USA) から購入した。Ketokonazole、fluvoxamine 及び dexamethasone は和光純薬（大阪）から購入した。その他の試薬はすべて第一章と同じ試薬を使用した。

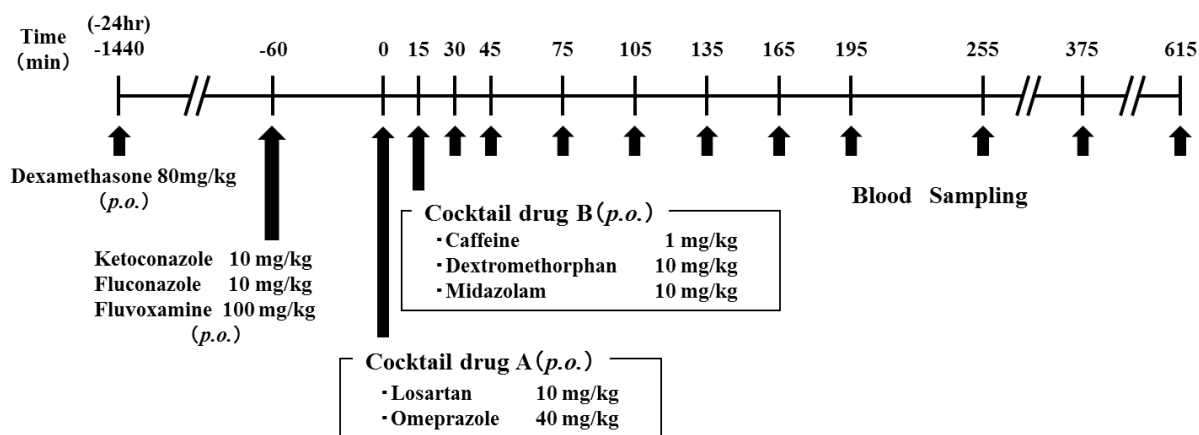


Fig. 5 Study design for administrations of cocktail drug and inducer or inhibitor.

2-2-2. 試験方法

前章と同じく、caffeine、losartan、omeprazole、dextromethorphan、midazolam を CYP 基質薬 (カクテル薬) として使用した。雄性 SD 系ラット (7-9 週齢、体重 237.5 ± 27.5 g、日本エスエルシー、静岡) に losartan (10 mg/kg) 及び omeprazole (40 mg/kg) を、0.1% diethylamine を含む 0.5% carboxymethylcellulose に懸濁した投与液 (カクテル薬 A) を単回経口投与し、その 15 分後に caffeine (1 mg/kg)、dextromethorphan (10 mg/kg) 及び midazolam (10 mg/kg) の 1% carboxymethylcellulose 懸濁液 (カクテル薬 B) を単回経口投与した。カクテル薬 A 投与後 30、45、75、105、135、165、195、255、375、615 分に大腿動脈に挿入したカニューレより採血を行った。さらに、CYP 誘導薬として dexamethasone (80 mg/kg) の 1% carboxymethylcellulose 懸濁液をカクテル薬投与 24 時間前に、あるいは CYP 阻害薬として ketoconazole (10 mg/kg)、fluvoxamine (100 mg/kg) の 1% carboxymethylcellulose 懸濁液ないし fluconazole (10 mg/kg) 水溶液をカクテル薬投与 1 時間前に投与して同様の実験を行った (Fig. 5)。なお、control 群には生理食塩水を投与した。1 回採血量は 150 μ L とした。血液より血漿サンプルを分離し -80°C で測定まで保存した。

2-2-3. 血漿中薬物及び代謝物濃度の測定

血漿サンプルの前処理は、1 章の方法を一部改変して行った。すなわち、血漿サンプル 50 μ L に内部標準物質として nitrazepam (100 ng/mL) 50 μ L を添加し、acetonitrile 150 μ L を加えた。固相抽出 (OstroTM 96-Well Plate) を行い、抽出液を 0.2 μ m のマイクロフィルタ (Millex-LG, 0.20 μ m) で濾過し、10 μ L を LC-MS/MS 用試料とした。LC-MS/MS の測定は、1-2-2-4 の方法に準じて行った。

2-2-4. 薬物動態学的パラメータの算出

各薬物及び代謝物の薬物動態学的パラメータはノンコンパートメント解析法により算出した。AUC_{0-t}は以下の式で表される：

$$AUC_{0-t} = \int_0^t C \, dt$$

C：血漿中濃度

t：最終測定時間

AUC は最終測定時間 (t_s)までを台形公式により算出した。

各 AUC 比は、次式により算出した：

$$AUC \text{ 比} = \frac{AUC_{\text{metabolite}}}{AUC_{\text{drug}}}$$

2-2-5. データ解析

データは平均値±標準偏差で表示した。統計解析には統計解析は GraphPad Prism software (version 5.0, GraphPad, San Diego, CA, USA) を用いて行った。カクテル薬投与群間の薬物動態学的パラメータの統計学的有意差の判定は、Dunnett の多重比較検定により行った。全ての統計学的解析において危険率 5%未満を有意差ありと判定した。

第3節 実験結果

2-3-1. Caffeine 及び paraxanthine の血漿中薬物濃度推移

Caffeine 及び paraxanthine の血漿中濃度は、control 群においてカクテル薬投与後 360 分まで検出された (Fig. 6a)。paraxanthine は control 群において 600 分では検出限界以下であった。caffeine の C_{\max} 及び $AUC_{0-360\min}$ は control 群と比較して、fluvoxamine の前投与によりそれぞれ 1.7 倍及び 2.5 倍に有意に増加した (Table 7)。一方、paraxanthine と caffeine の AUC 比には有意な変化を認められなかった (Table 7)。また、ketoconazole、fluconazole 及び dexamethasone を前投与した群においては、control 群と比較して薬物動態学的パラメータに有意な変化は認められなかった。

2-3-2. Losartan 及び E3174 の血漿中薬物濃度推移

Losartan 及び E3174 の血漿中濃度は、control 群においてカクテル薬投与後 615 分まで検出された (Fig. 6b)。Losartan の C_{\max} 及び $AUC_{0-615\min}$ は control 群と比較して、dexamethasone の前投与によりそれぞれ 2.0 倍及び 1.9 倍に有意に増加した (Table 7)。また losartan の AUC 比は、fluvoxamine あるいは dexamethasone の前投与によりそれぞれ 56% 及び 81% 有意に減少した (Table 7)。また、ketoconazole あるいは fluconazole を前投与した群においては、control 群と比較して薬物動態学的パラメータに有意な変化は認められなかった。

2-3-3. Omeprazole 及び 5-hydroxyomeprazole の血漿中濃度推移

Omeprazole 及び 5-hydroxyomeprazole の血漿中濃度は、control 群においてカクテル薬投与後 375 分まで検出された (Fig. 6c)。Fluconazole の前投与により、omeprazole の $AUC_{0-375\min}$ は control 群と比較して、2.2 倍に有意に増加したが (Table 7)、 C_{\max} 及び AUC 比には有意な差は認められなかった (Table 7)。また ketoconazole、fluvoxamine あるいは dexamethasone を前投与した群においては、control 群と比較して薬物動態学的パラメータに有意な変化は認められなかった。

2-3-4. Dextromethorphan 及び dextrorphan の血漿中濃度推移

Dextromethorphan の血漿中濃度は、control 群においてカクテル薬投与後 360 分まで検出された (Fig. 6d)。Fluconazole あるいは fluvoxamine を前投与した群においては、control 群と比較して薬物動態学的パラメータに有意な変化は認められなかった。また、ketoconazole あるいは dexamethasone を前投与した群の dextromethorphan の血漿中濃度は、カクテル薬投与後 30 分で検出限界以下であったため、薬物動態学的パラメータを算出できなかった (Table 7)。

2-3-5. Midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の血漿中濃度推移

Midazolam の血漿中濃度は control 群においてカクテル薬投与後 360 分まで検出された (Fig. 6e)。Midazolam の C_{\max} は control 群と比較して、dexamethasone の前投与により 92% 有意に低下し、 $AUC_{0-360\min}$ は fluconazole の前投与により 133% に有意に増加した (Table 7)。また

dexamethasone の前投与により $AUC_{0-360min}$ が減少する傾向が認められた。一方、midazolam の AUC 比は dexamethasone の前投与により 338%に有意に上昇した (Table 7)。

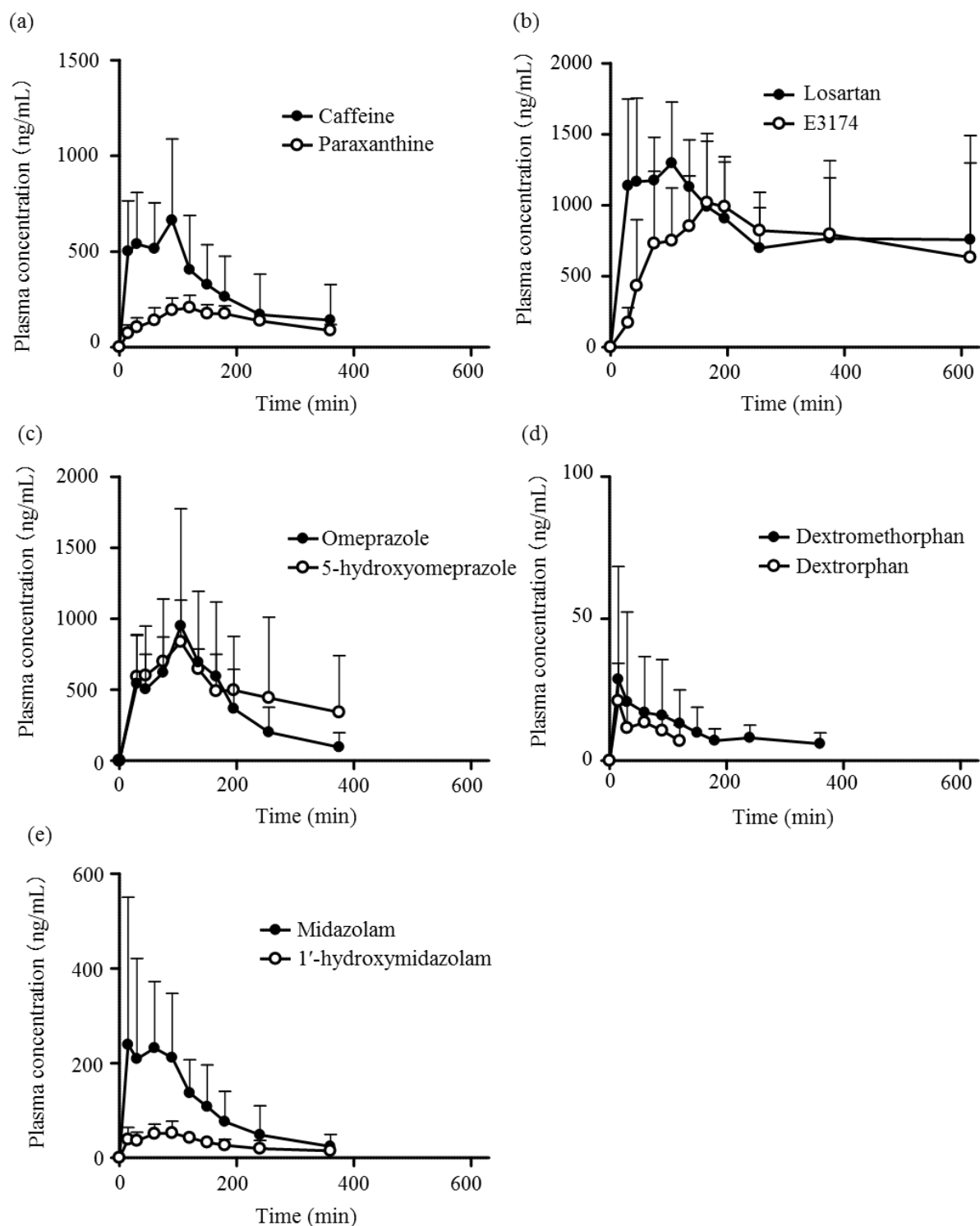


Fig. 6 Time course of plasma concentrations of CYP probe drugs and their metabolites, following oral administration to 7 rats. Each point represents the mean \pm SD.

(a): caffeine and paraxanthine, (b): losartan and E3174, (c): omeprazole and 5-hydroxyomeprazole, (d): dextromethorphan and dextrorphan, (e): midazolam and 1'-hydroxymidazolam.

また ketoconazole あるいは fluvoxamine を前投与した群においては、control 群と比較して薬物動態学的パラメータに有意な変化は認められなかった。

Table 7 Maximum plasma concentration (C_{\max}) and AUC of caffeine, losartan, omeprazole, dextromethorphan and midazolam after oral administration of cocktail drugs in rats treated with vehicle (control), ketoconazole, fluconazole, fluvoxamine and dexamethasone.

Treatment	C_{\max} (ng/mL)	AUC (min \cdot μ g/mL)	AUC _{metabolite} /AUC _{drug}
Caffeine (0-360 min)			
control	851 \pm 299	110.4 \pm 61.9	0.810 \pm 0.625
ketoconazole	845 \pm 313	192.6 \pm 76.3	0.242 \pm 0.062
fluconazole	986 \pm 291	173.2 \pm 63.5	0.356 \pm 0.114
fluvoxamine	1451 \pm 215*	384.8 \pm 62.4*	0.059 \pm 0.030
dexamethasone	830 \pm 180	151.7 \pm 84.6	0.540 \pm 0.841
Losartan (0-615 min)			
control	1599 \pm 527	503.1 \pm 187.9	0.996 \pm 0.374
ketoconazole	1363 \pm 362	596.6 \pm 182.3	0.659 \pm 0.254
fluconazole	1850 \pm 1366	528.7 \pm 216.2	1.239 \pm 0.311
fluvoxamine	1560 \pm 1299	378.5 \pm 232.6	0.440 \pm 0.103*
dexamethasone	3182 \pm 711*	909.7 \pm 195.5*	0.185 \pm 0.087*
Omeprazole (0-375 min)			
control	1028 \pm 712	145.2 \pm 71.2	1.220 \pm 0.655
ketoconazole	600 \pm 385	93.1 \pm 57.0	1.221 \pm 0.302
fluconazole	1840 \pm 940	322.4 \pm 143.0*	0.857 \pm 0.238
fluvoxamine	1482 \pm 962	199.0 \pm 92.1	1.061 \pm 0.453
dexamethasone	264 \pm 115	34.1 \pm 12.6	1.544 \pm 0.658
Dextromethorphan (0-360 min)			
control	30 \pm 39	3.2 \pm 3.8	0.447 \pm 0.281
ketoconazole	n.d.	n.d.	n.d.
fluconazole	62 \pm 60	6.3 \pm 4.8	0.596 \pm 0.270
fluvoxamine	46 \pm 43	8.9 \pm 7.7	0.682 \pm 0.235
dexamethasone	n.d.	n.d.	n.d.
Midazolam (0-360 min)			
control	336 \pm 267	37.2 \pm 23.8	0.338 \pm 0.135
ketoconazole	246 \pm 138	36.7 \pm 22.7	0.367 \pm 0.295
fluconazole	450 \pm 156	86.6 \pm 27.5*	0.291 \pm 0.143
fluvoxamine	594 \pm 65	55.9 \pm 13.9	0.555 \pm 0.163
dexamethasone	28 \pm 20*	3.0 \pm 1.7	1.479 \pm 0.464*

Values are mean \pm SD. (n = 4–7), *significant difference ($P < 0.05$) between control and ketoconazole, fluconazole, fluvoxamine, or dexamethasone. n.d. = not detected.

第4節 考察

カクテル試験は複数の基質薬を混合したカクテル薬を被験者に投与し、その体内動態を検討することにより、それらの活性を *in vivo* で一度に評価できる試験法であるが、これまで動物実験に応用した報告はほとんどなかった。そこで本章では、実験動物として汎用されるラットを用いてカクテル試験を行い、網羅的な CYP 活性評価が可能か検討した。さらに CYP 誘導薬である dexamethasone、CYP 阻害薬である ketoconazole、fluconazole 及び fluvoxamine の前投与による CYP 活性への影響について評価した。

CYP1A 活性は caffeine と paraxanthine により評価した。Fluvoxamine の前投与により C_{\max} 及び $AUC_{0-360\min}$ はそれぞれ約 2 倍及び約 3.5 倍へと有意に上昇した。Culm-Merdek らは臨床試験において、fluvoxamine 投与により CYP1A2 が阻害され caffeine の C_{\max} 及び AUC がそれぞれ 1.4 倍及び 13.7 倍へと有意に上昇することを報告している³⁸⁾。また Kot らの報告によれば、fluvoxamine は *in vitro* 試験において強力な CYP1A2 の阻害薬であり、程度は異なるもののラットにおいても強力な CYP1A 阻害薬であるとされている³⁹⁾。本研究の結果はこれらの報告と同様の結果であり、fluvoxamine による CYP1A 阻害作用を検出可能であると考えられた。

CYP3A 活性は、ヒト及びラットにおいて代表的な CYP3A 基質である midazolam と、代謝物の 1'-hydroxymidazolam により評価を行った。Fluconazole の前投与により midazolam の $AUC_{0-360\min}$ が約 2 倍となり、1'-hydroxymidazolam との AUC 比は減少した。一方、dexamethasone の前投与により midazolam の C_{\max} 、 $AUC_{0-360\min}$ 及び AUC 比は減少した。これらの結果は、ヒト及びラットにおけるこれまでの報告と一致する^{34,40-41)}。Ketoconazole の前投与による薬物動態学的パラメータの変動は認められなかった。これまでにラットにおける ketoconazole の CYP3A 阻害作用の報告は一致しておらず、ketoconazole の前投与によって nevirapine や midazolam の C_{\max} や AUC が上昇するという報告がある⁴⁰⁻⁴¹⁾一方で、ketoconazole による CYP3A 阻害作用は、ヒトよりもラットにおいて弱いと報告されている⁴²⁾。Kushimoto らの報告では ketoconazole の投与量を 5 mg/kg、20 mg/kg、50 mg/kg の 3 用量で試験を行っており⁴⁰⁾、高用量ほど CYP3A 阻害作用が強くなっているため、本章の試験でも ketoconazole の投与量を増量すれば CYP3A の阻害作用を検出できるかもしれない。

CYP2C は、ラットにおいて CYP2C6、CYP2C7、CYP2C11、CYP2C12、CYP2C13、CYP2C22、及び CYP2C23 などのアイソフォームが含まれるが、CYP2C11 は、雄性ラットの肝臓中の主要なアイソフォームである⁴³⁻⁴⁴⁾。従って本章では、ヒトにおいてそれぞれ CYP2C9 及び CYP2C19 の選択的基質薬である losartan 及び omeprazole の両方を使用して CYP2C 活性を評価した。Fluvoxamine の前投与により、losartan の AUC 比は約 1/2 となった。fluvoxamine は CYP1A2、CYP2D6 及び CYP2C19 に対する阻害作用を持つことが報告^{19,20)}されているが、CYP2C9 に対する阻害作用は知られていない。本研究では、losartan の $AUC_{0-615\min}$ は変化せず AUC 比のみが有意に低下していた。一方 dexamethasone の前投与により losartan の $AUC_{0-615\min}$ 及び AUC 比はそれぞれ約 2 倍及び約 1/3 となった。dexamethasone に関して CYP 誘導作用は報告されているが、CYP 阻害作用は知られていない。多発性骨髄腫に対する治療における投与量は、通常、成人には dexamethasone として 40 mg を 1 日 1 回であり成人の体重を 60-65 kg

とすると、0.62-0.67 mg/kg/日である。本章の試験では CYP の誘導を確実に起こすために dexamethasone の投与量を臨床用量に比べて非常に高用量である 80 mg/kg に決定した。さらに dexamethasone の半減期は 4-5 時間であり、投与後 24 時間においても残存している。これらのことを踏まえると、dexamethasone は高用量では CYP2C を阻害する作用があり、本研究の試験では前投与した dexamethasone が残存していたことにより losartan の代謝が阻害された可能性がある。

また、omeprazole と 5-hydroxyomeprazole の薬物動態学的パラメータを算出したところ、fluconazole の前投与により $AUC_{0-375\text{min}}$ が有意に増加し、AUC 比が減少する傾向が見られた。ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* の研究において、fluconazole は CYP2C9、CYP2C19 及び CYP3A4 の阻害作用が報告されている⁴⁵⁾。よって、omeprazole の $AUC_{0-375\text{min}}$ の増加は、fluconazole の前投与により CYP2C が阻害されたためだと考えられる。一方、dexamethasone の前投与により、CYP3A 基質である midazolam と同じく、omeprazole の $AUC_{0-375\text{min}}$ は減少する傾向が見られた。Omeprazole は主に CYP2C19 による代謝を受けるが、一部 CYP3A4 による代謝を受けることが知られている⁴⁶⁾。そのため、ラットにおいても omeprazole の代謝に CYP2C に加え CYP3A が関与している可能性は否定できない。

CYP2D は、ヒト及びラットにおいて高い配列同一性を有することが報告されている⁴⁷⁾。CYP2D 活性は、dextromethorphan と dextrorphan により評価したところ、 C_{max} 、AUC 及び AUC 比のいずれにおいても有意な差は認められなかった。しかし、dextromethorphan 及び dextrorphan の血漿中濃度は他の薬物に比較して低い値で推移している。これらはグルクロン酸抱合を受け尿中へと排泄されるため、dextromethorphan を用いて活性評価をする場合には尿検体を用いて行うこともあり、CYP2D 活性を評価するには尿検体による検討が必要かもしれない。

以上の結果より、カクテル薬投与後の血漿中薬物濃度推移から AUC 及び代謝比が算出され、ラットの CYP 活性の網羅的な解析が可能であった。さらに ketoconazole、fluconazole、fluvoxamine 及び dexamethasone による CYP 活性の変動が示唆された。よって、カクテル試験はラットにも応用可能であり、複数の CYP 活性を網羅的に解析できることが明らかとなった。この手法はラットを用いた簡便な薬物相互作用スクリーニング法としても期待される。

第3章 健康成人カクテル試験を用いた rifampicin による CYP 活性変動の網羅的解析

第1節 緒言

Rifampicin は結核治療に不可欠な薬剤の一つであり、細菌の DNA 依存性 RNA ポリメラーゼに作用し、RNA 合成を阻害することで抗菌作用を示す⁴⁸⁾。結核はその高い伝染力と致死性から世界的に重要な疾患であるため、rifampicin もまた臨床的に重要視されている。Rifampicin 服用中の患者は合併症を持つ場合が多いため、一般的に rifampicin に加え、同時に数種類の併用薬を服用している。しかし、rifampicin には強力な CYP 誘導作用が知られており、併用薬の血漿中濃度を著しく低下させ、臨床効果を低下させる⁴⁹⁾。これまでに rifampicin による CYP 誘導作用については主に CYP3A4 に関して報告され、これに加え CYP2C9 や CYP2C19 も誘導されることが報告されている⁴⁹⁻⁵²⁾。一方、CYP1A2 や CYP2D6 の誘導に関しては明らかにされていない。

カクテル試験は、前章までに述べたように、複数の CYP 活性を一度に評価することができることから、各々の CYP 活性を単独に評価する場合と比べ、被験者の負担を減少させることができるかと期待される。しかしながら、これまでなされたカクテル試験の報告では、基質薬の単独投与とカクテル薬投与における薬物動態の変動について検討し、基質薬物同士による薬物相互作用の有無を検証しているものが多く、実際にカクテル試験を用いて代謝酵素の誘導薬や阻害薬の影響を検討した報告はわずかである^{22-25,53)}。

上述のように rifampicin 服用患者では多剤の併用がなされることが多い。それら潜在的に存在する薬物相互作用の可能性を予測することは、rifampicin による薬物治療上、非常に有用である。そこで本章では第1章で確立したカクテル試験を応用し、健康成人を対象としたカクテル試験を実施した。すなわち、ヒトにおける強力な CYP3A4 誘導作用が報告されている rifampicin を対象として、これまでに報告のなかった CYP 分子種を含む5種の CYP (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4) 活性の変動を網羅的に検出した。さらにそれらの誘導作用がどれだけの期間持続するかについては、CYP3A4 を含めこれまでに知られていない。そこで本章では rifampicin 投与終了後にカクテル試験を繰り返し行い、CYP 活性の変動を経時的に評価した。

第2節 実験方法

3-2-1. 試薬

Rifampicin (リファジンカプセル)は、第一三共 (東京)から購入した。その他の試薬は全て第1章と同じ試薬を使用した。

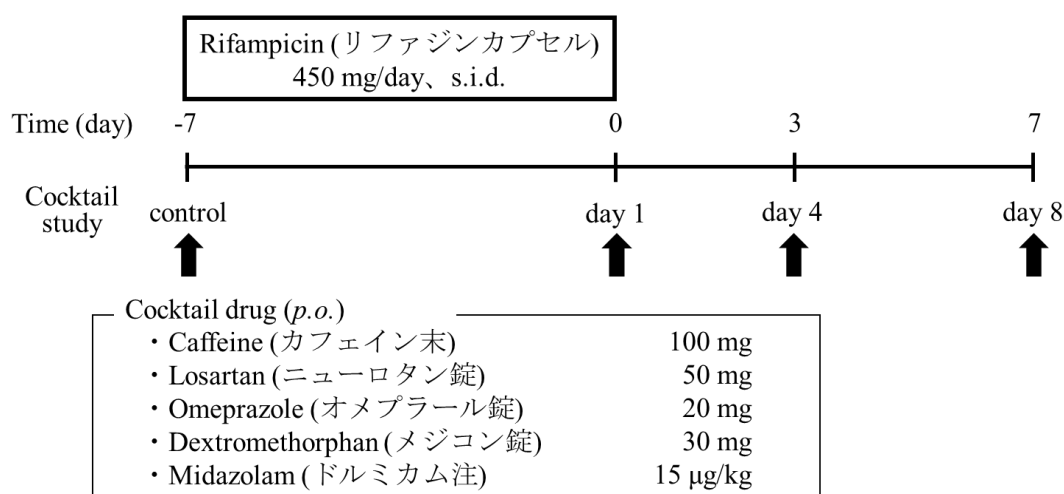


Fig. 7 Study design for administrations of cocktail drug and rifampicin.

3-2-2. 対象

被験者は健康成人男性 13 名で、年齢 33.6 ± 2.4 歳、体重 71.1 ± 10.9 kg であった。被験者は本試験の目的、方法、予測される効果、自由意思による試験への参加及び同意撤回の任意性などについて十分に説明を受け、文書にて試験への参加に同意した。また試験 3 日前より、caffeine を含有する飲料の摂取を禁止した。本試験計画書は浜松医科大学及び静岡県立大学倫理委員会において承認され、ヘルシンキ宣言を遵守して実施した。

3-2-3. 試験方法

被験者は rifampicin (リファジンカプセル、450 mg) を朝 1 回 1 週間服用した。rifampicin 投与前 (control)、1 週間投与後 (day 1)、終了 3 日後 (day 4)、終了 7 日後 (day 8) にカクテル試験を行った。カクテル試験は 1-2-3-2 の方法に準じて行った。すなわち、被験者はカフェイン「ホエイ」(caffeine、100 mg)、ニューロタン錠(losartan、50 mg)、オメプラール錠(omeprazole、20 mg)、メジコン錠(dextromethorphan、30 mg)、ドルミカム注(midazolam、15 µg/kg) をカクテル薬として同時に服用した。薬物投与前、投与後 0.5、1、1.5、2、3、4、6 及び 8 時間に採血を行った。1 回採血量は 7 mL とし、血液より血漿サンプルを分離し -80°C で保存した。また薬物直前から投与後 8 時間まで蓄尿を行い、 -80°C で保存した。

3-2-4. 血漿及び尿中薬物及び代謝物濃度の測定

3-2-4-1. サンプル前処理方法

1-2-2-1. 及び 1-2-2-2. で記した方法を用いて、血漿中及び尿中の薬物濃度及び主代謝物濃度を測定した。

3-2-4-2. LC-MS/MS 条件

1-2-2-4. に準じた方法で測定を行った。

3-2-5. データ解析

各薬物及び代謝物の薬物動態学的パラメータは2-2-4.に従って算出した。各基質薬物によるCYP活性の評価は、各基質薬物の薬物動態学的パラメータに加え以下の指標を用いた。すなわち、CYP1A2 および CYP2C19 活性の評価には、それぞれカクテル薬投与後 4 時間における caffeine/paraxanthine 血漿中濃度比および omeprazole/5- hydroxyomeprazole 血漿中濃度比を用いた。CYP2C9 および CYP2D6 活性に対しては、それぞれ投与後 8 時間までの losartan/E3174 および dextromethorphan/dextrorphan 尿中排泄量比を用いた。CYP3A4 活性に対しては、投与後 8 時間までの midazolam と 1'-hydroxymidazolam の AUC 比 ($AUC_{\text{midazolam}}/AUC_{1'\text{-hydroxymidazolam}}$)を用いた。

データは平均値±標準偏差で表示した。統計解析は GraphPad Prism software (version 5.0; GraphPad, San Diego, CA, USA) を用いて行った。カクテル薬投与群間の薬物動態学的パラメータの統計学的有意差の判定は、対応のある t 検定を行った。Control 群を基準とし、day 1、day 4 及び day 8 を比較したため、合計 3 回の検定を行った。全ての統計学的解析において、Bonferoni 補正により危険率 1.7%未満を有意差ありと判定した。

第 3 節 実験結果

3-3-1. Caffeine 及び paraxanthine の血漿中濃度推移及び CYP1A2 活性評価

カクテル薬投与後、caffeine の血漿中濃度はすべての投与日において 0.5–2 時間で最高値を示し、paraxanthine は 0.5–3 時間で最高値を示した。caffeine、paraxanthine とともに投与後 8 時間における血漿中濃度を測定でき、投与後 8 時間では完全には消失しなかった (Fig. 8)。Caffeine と paraxanthine の C_{max} は control と比べどの試験日にも有意な変動は認めなかったが、day 1 で測定した caffeine の AUC のみ control に比べ 37%有意に低下した (Table 8)。

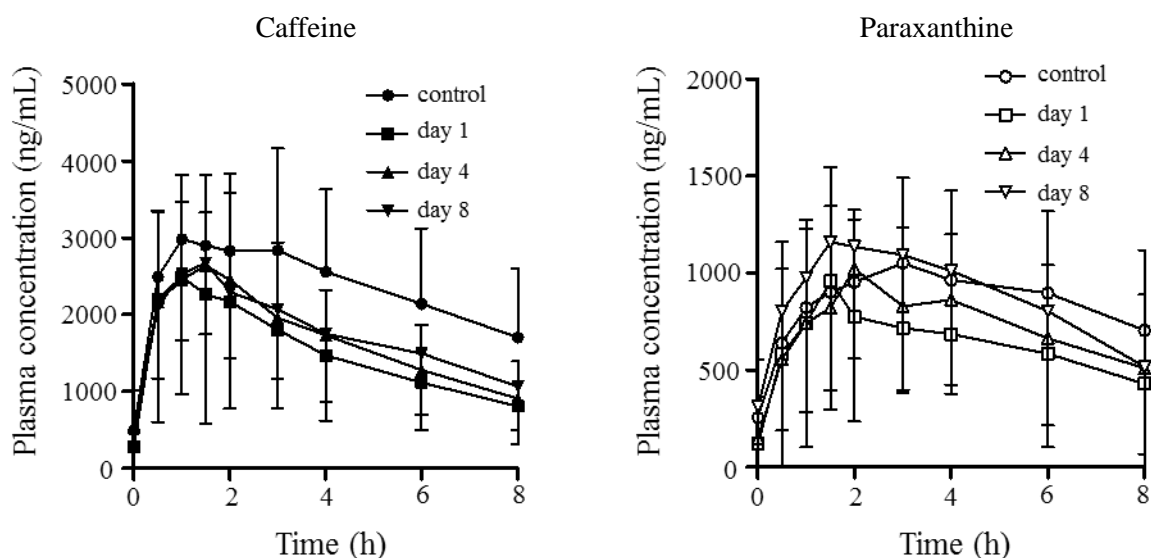


Fig. 8 Plasma concentration of caffeine and paraxanthine after oral administration of cocktail drugs on control day and days 1, 4 and 8 in healthy volunteers. Each point represents mean ±SD. (n=13).

3-3-2. Losartan 及び E3174 の血漿中濃度推移及び CYP2C9 活性評価

すべての被験者において losartan は 0.5–3 時間の間に血漿中濃度が最大となり、E3174 は 2–6 時間で最高値を示した。また投与後 0.5 時間における E3174 の血漿中濃度は検出限界以下であった (Fig. 9)。Losartan および E3174 の C_{\max} は control に比べ day 1 と day 4 で有意に低下し、day 8 で回復した。同様に AUC においても day 1 では 51%、day 4 では 44% 有意な低下を示した。この減少は day 8 でも持続した (Table 8)。

3-3-3. Omeprazole 及び 5-hydroxyomeprazole の血漿中濃度推移及び CYP2C19 活性評価

Control における omeprazole および 5-hydroxyomeprazole の血漿中濃度は薬物投与後 1.5 時間まで検出限界以下 (Fig. 10) であった。さらに、カクテル薬投与後、omeprazole は 1.5–3 時間、5-hydroxyomeprazole は 3–4 時間で血漿中濃度が最高値を示した。Omeprazole の day 1 で測定した C_{\max} および AUC は control に比べ著しく低下し、それぞれ 83% および 89% 有意に低値を示した。この有意な減少は day 4 でも持続し、day 8 には回復した (Table 8)。

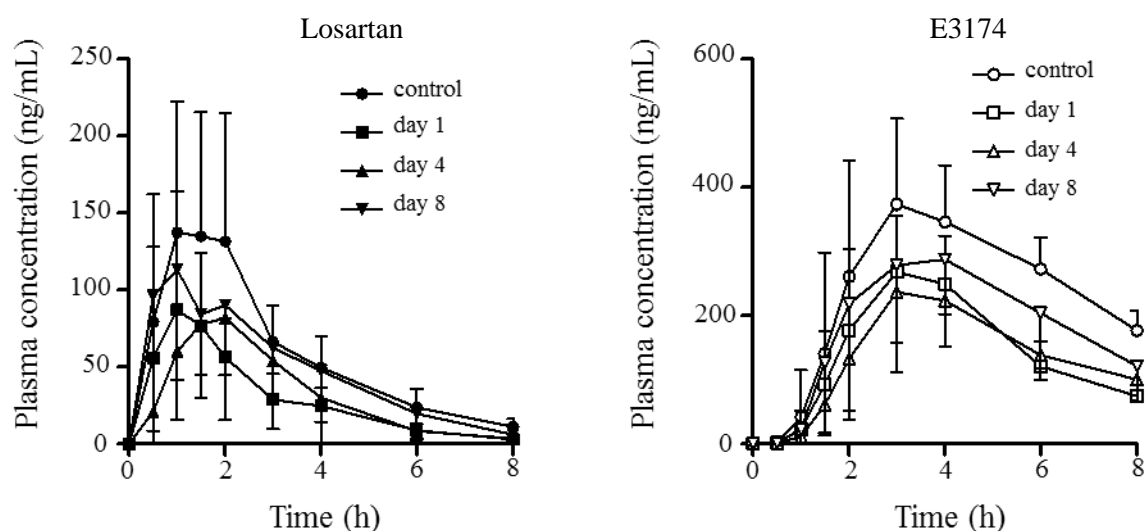


Fig. 9 Plasma concentration of losartan and E3174 after oral administration of cocktail drugs on control day and days 1, 4 and 8 in healthy volunteers. Each point represents mean \pm SD. (n=13).

Table 8 Maximum plasma concentration (C_{\max}) and AUC_{0-8h} after oral administration of cocktail drugs on control day and day 1, 4 and 8 in healthy volunteers.

	C_{\max}	AUC_{0-8h}
Caffeine	($\mu\text{g/mL}$)	($\text{hr} \cdot \mu\text{g/mL}$)
control	3.41 ± 1.07	18.8 ± 7.09
day 1	2.74 ± 1.28	$11.9 \pm 5.83^*$
day 4	2.94 ± 1.86	13.3 ± 7.67
day 8	3.09 ± 1.23	15.9 ± 8.91
Losartan	(ng/mL)	($\text{hr} \cdot \text{ng/mL}$)
control	210 ± 79.6	463 ± 111
day 1	$101 \pm 56.5^*$	$225 \pm 106^*$
day 4	$99.0 \pm 31.4^*$	$257 \pm 64.7^*$
day 8	156 ± 69.7	$368 \pm 135^*$
Omeprazole	(ng/mL)	($\text{hr} \cdot \text{ng/mL}$)
control	419 ± 307	802 ± 847
day 1	$70.8 \pm 115^*$	$84.9 \pm 125^*$
day 4	$109 \pm 126^*$	$184 \pm 271^*$
day 8	316 ± 351	716 ± 1240
Dextromethorphan	(ng/mL)	($\text{hr} \cdot \text{ng/mL}$)
control	2.02 ± 2.21	9.57 ± 11.3
day 1	1.42 ± 1.76	$4.63 \pm 7.36^*$
day 4	1.39 ± 1.89	4.87 ± 7.25
day 8	1.49 ± 1.84	6.47 ± 9.31
Midazolam	(ng/mL)	($\text{hr} \cdot \text{ng/mL}$)
control	5.71 ± 2.94	15.2 ± 4.37
day 1	$1.80 \pm 0.71^*$	$2.71 \pm 1.26^*$
day 4	$2.61 \pm 1.52^*$	$4.32 \pm 2.92^*$
day 8	4.66 ± 2.02	11.5 ± 5.62

Value are mean \pm SD. (n=13)

*: significant difference ($p < 0.01$) between the value on control day and that on days 1, 4 and 8.

3-3-4. Dextromethorphan 及び dextrorphan の血漿中濃度推移及び CYP2D6 活性評価

Dextromethorphan 及び dextrorphan の血漿中濃度は、カクテル薬投与後 1.5–2 時間で最高値を示し、以後経時的に減少した (Fig. 11)。Dextromethorphan の AUC は day 1 においてのみ control に比べて 52% 有意な低下を認めた (Table 8)。

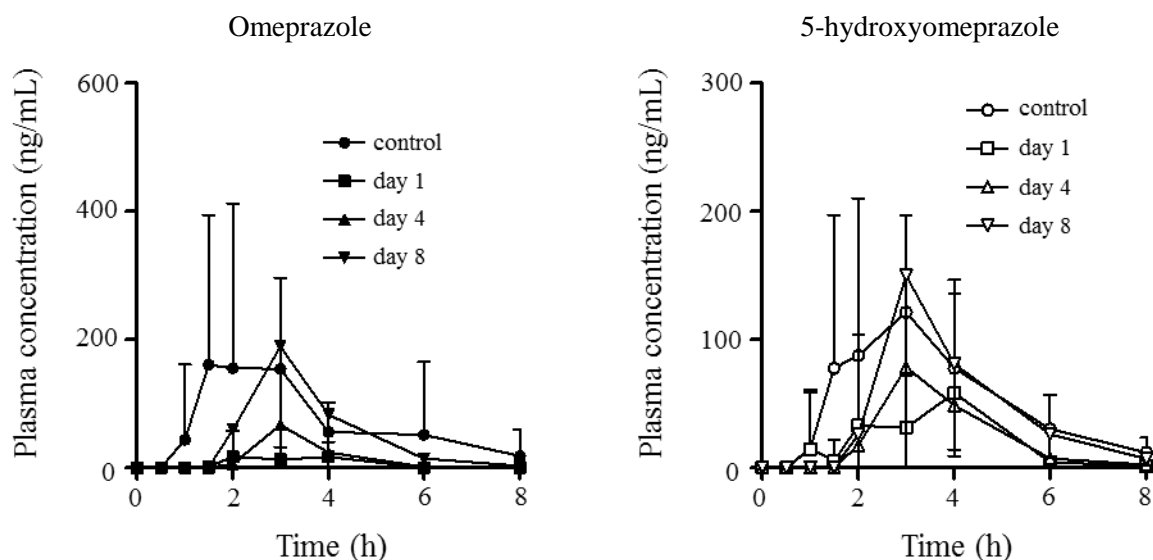


Fig. 10 Plasma concentration of omeprazole and 5-hydroxyomeprazole after oral administration of cocktail drugs on control day and days 1, 4 and 8 in healthy volunteers. Each point represents mean \pm SD.(n=13).

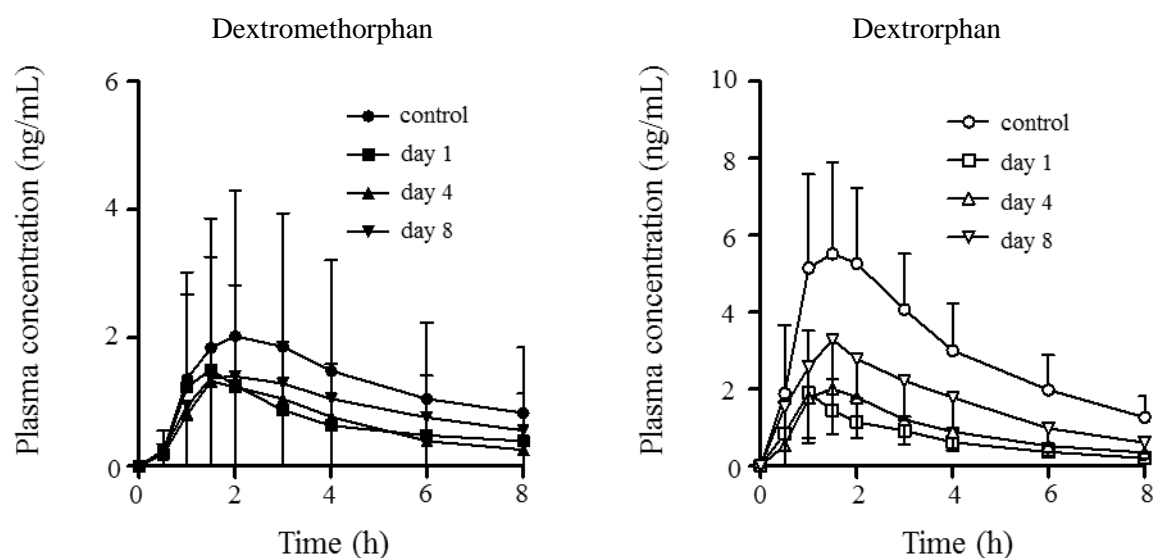


Fig. 11 Plasma concentration of dextromethorphan and dextrorphan after oral administration of cocktail drugs on control day and days 1, 4 and 8 in healthy volunteers. Each point represents mean \pm SD. (n=13).

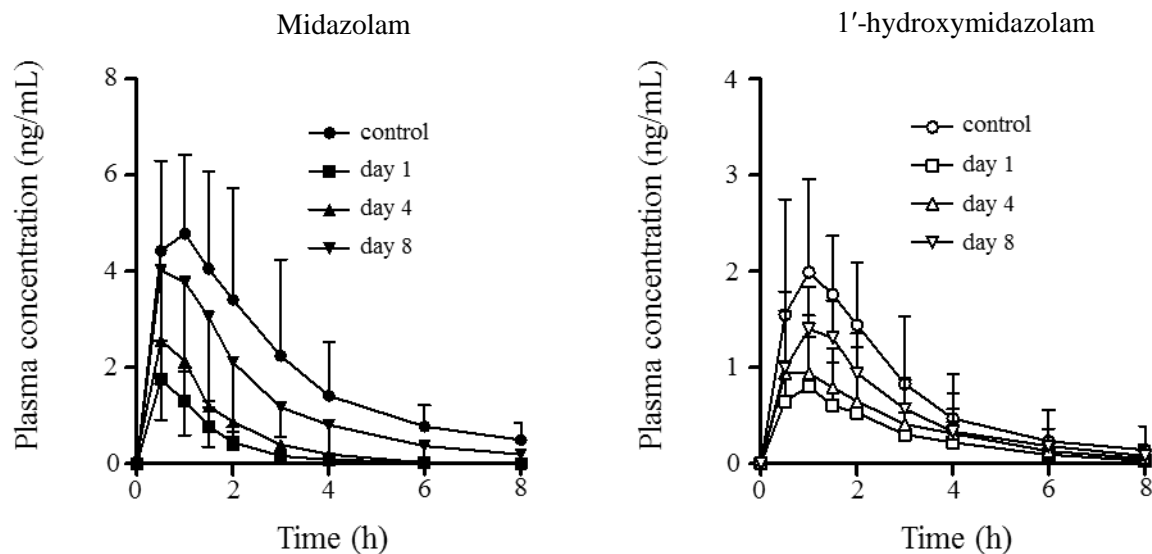


Fig. 12 Plasma concentration of midazolam and 1'-hydroxymidazolam after oral administration of cocktail drugs on control day and days 1, 4 and 8 in healthy volunteers. Each point represents mean \pm SD. (n=13).

3-3-5. Midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の血漿中濃度推移及び CYP3A4 活性評価

Midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の血漿中濃度はカクテル薬投与後 1 時間で最高値を示し、以後経時的に減少した (Fig. 12)。Midazolam 及び 1'-hydroxymidazolam の day 1 及び day 4 で測定した C_{max} および AUC は control に比べ著しく低下し、day 1 ではそれぞれ 68% および 82%、day 4 ではそれぞれ 54% および 72% 有意に低値であった。この有意な減少は day 8 に回復した (Table 8)。

3-3-6. 各基質薬物の CYP 活性指標を用いた活性評価

各基質薬物による CYP 活性の評価は、これまでの報告からそれぞれの基質薬物に特異的な CYP 活性指標を用いた (Fig. 13)。

CYP1A2 活性をカクテル薬投与後 4 時間の血漿中濃度比 (caffeine/paraxanthine) で示したところ、濃度比に各試験日の間で有意な差異は認められなかった ($P=0.382$)。CYP2C9 活性は、カクテル薬投与後 0-8 時間の尿中 losartan 及び E3174 濃度比により評価した。尿中濃度比は control (0.79) に比べ day 1 では 0.61 と 23% 低値を示す傾向が認められた ($P=0.025$)。CYP2C19 活性は、omeprazole と 5-hydroxyomeprazole のカクテル薬投与後 4 時間後の血漿中濃度比 (omeprazole/5-hydroxyomeprazole) で評価した。血漿中濃度比は、day 1 及び day 4 ($P=0.009$) において control と比較して有意 ($P=0.002$ 及び $P=0.009$) に低下した。CYP2D6 活性をカクテル薬投与 8 時間後までの尿中排泄量比 (dextromethorphan/dextrorphan) で評価したところ、各試験日間に有意な差は認められなかった。CYP3A4 活性を示す $AUC_{midazolam}/AUC_{1'-hydroxymidazolam}$ は、day 1 及び day 4 においてそれぞれ 70% 及び 54% 有意に低値を示し、day 8 では control と有意な差異を認めなかった。

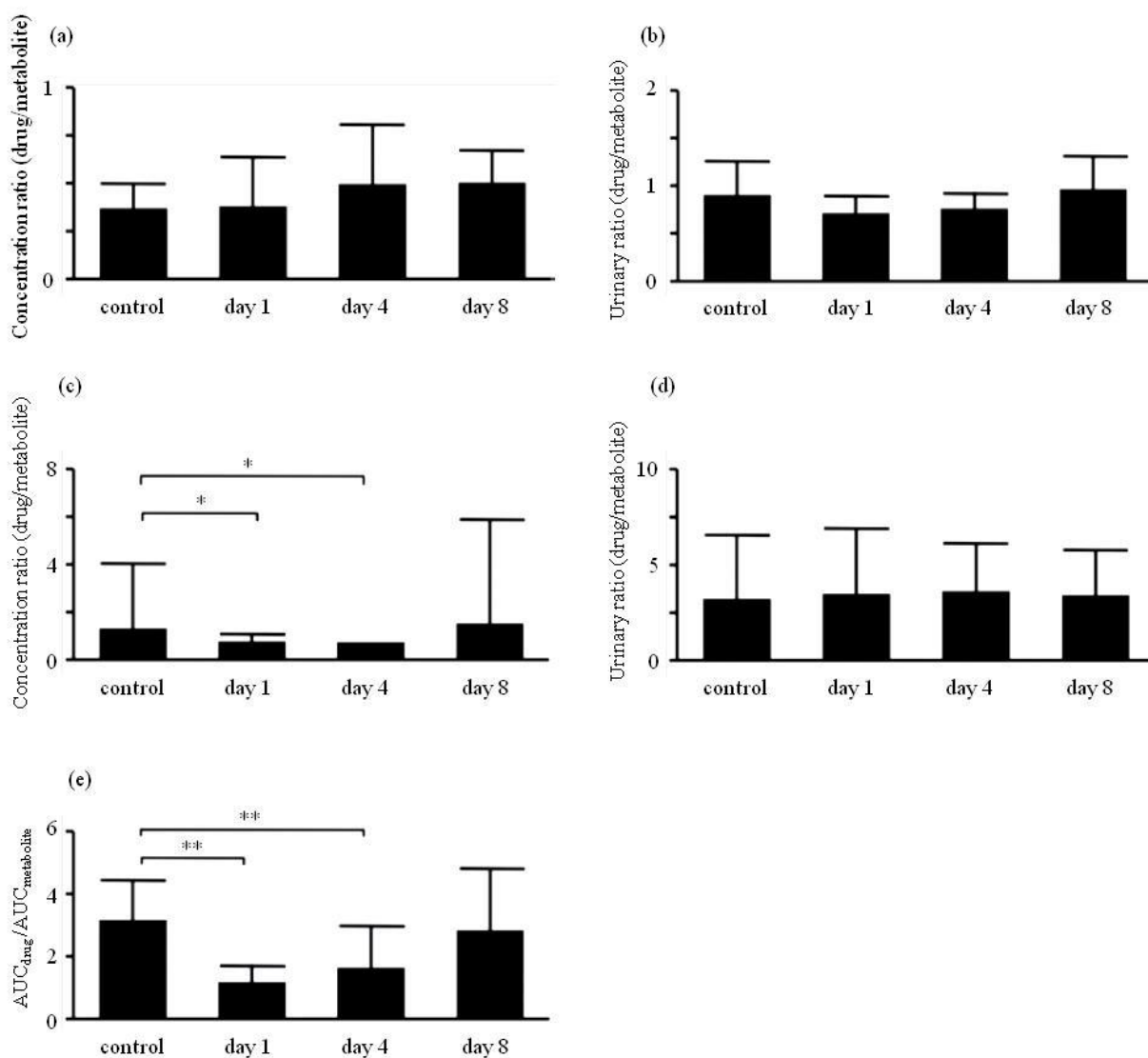


Fig. 13 Phenotype assessment of CYP isozymes. (a): CYP1A2, (b): CYP2C9, (c): CYP2C19, (d): CYP2D6, (e): CYP3A4.

AUC or concentration ratio was calculated using the probe drug as the numerator and its metabolite as the denominator in plasma or urine samples. CYP1A2 and CYP2C19 activities were assessed using caffeine/paraxanthine and omeprazole/5-hydroxyomeprazole concentration ratios, respectively, in a 4h plasma sample. CYP2C9 and CYP2D6 activities were assessed using the 0–8 h urinary ratios of losartan/E3174 and dextromethorphan/dextrorphan, respectively. For CYP3A, the ratio of the AUC_{0-8h} of 1'-hydroxymidazolam relative to the AUC_{0-8h} of midazolam was calculated. The decrease in the ratio signifies enzyme induction. * $P < 0.01$, ** $P < 0.016$ as compared with the ratio before rifampicin administration. Values are presented as the geometric mean \pm SD.

第4節 考察

カクテル試験は、複数のCYP活性を一度に評価することができるという特長を有しており、各々のCYP活性を単独に評価する場合と比べ、被験者の負担を減少させることができると考えられる。しかしこれまで、実際にカクテル試験を用いてCYPの誘導薬や阻害薬の影響を検討した報告は少ない。そこで本章では、カクテル試験の薬物相互作用の評価への応用を目的として、健康成人13名を対象とした臨床試験を行い、代表的な結核治療薬であり、CYP3A4誘導作用が報告されているrifampicin投与による5種のCYP活性変動を経時的に評価した。

Rifampicinを7日間投与することにより、CYP2C19及びCYP3A4基質薬の血漿中濃度は著しく低下した。同様に、両CYPの活性指標であるomeprazoleと5-hydroxyomeprazoleの血漿中濃度比及び $AUC_{\text{midazolam}}/AUC_{1'\text{-hydroxymidazolam}}$ も有意に低下した。これらの結果はrifampicinの強力なCYP2C19およびCYP3A4誘導作用を示すものである。さらにこの誘導作用はrifampicin投与終了3日後まで持続し、投与終了7日後に回復することが明らかとなった。

さらに本研究ではrifampicin投与によりCYP2C9のlosartanのAUC有意な低下および尿中losartan/E3174濃度比の低下傾向が認められ、rifampicinの弱いCYP2C9誘導作用が示唆された。一方、CYP1A2及びCYP2D6活性は、rifampicin投与後の有意な変動が認められず、CYP2C9活性はrifampicin投与により上昇する傾向が見られた。従って本研究の結果、rifampicin投与中及び投与終了後はCYP3A4およびCYP2C19の基質となる併用薬は、投与量の調節が必要となることが明らかとなった。またCYP2C9基質薬物については一部影響を受ける可能性があり、一方CYP1A2及びCYP2D6基質薬では、rifampicin投与時においても臨床的に相互作用なしに使用できると考えられる。

本研究の結果から、rifampicinの7日間投与によるCYP2C9、CYP2C19及びCYP3A4活性の誘導の程度は、CYP活性指標により算出すると、それぞれ1.3倍、2.6倍及び3.3倍であった。これまでにrifampicinの誘導作用は主にCYP3A4について報告されているが、いくつかの研究ではCYP3A4以外のCYP、すなわちCYP2C9やCYP2C19への誘導作用も示されている⁵⁴⁻⁵⁶⁾。しかしながらこれらの試験ではそれぞれのCYP活性を単独に評価しており、rifampicinのCYP誘導作用の程度を直接比較することは難しい。本研究ではカクテル試験を用いて5種のCYP活性を網羅的に検出しており、それぞれ同一個体内での比較が可能であった。

これまでに併用薬によるCYP活性変動は、主にCYP阻害薬または誘導薬を投与した直後において評価されており、阻害薬または誘導薬中止後の時間経過によるCYP活性の変動はあまり注目されていなかった。そこで本章では、rifampicin投与終了後のCYP活性変動についてカクテル試験を応用して、経時的に評価した。その結果、rifampicinのCYP3A4及びCYP2C19誘導作用は投与終了直後(day 1)において最も大きく、3日後(day 4)においても持続し、投与終了7日後(day 8)には投与前(control)のレベルに回復することが明らかとなった。Beckmanらは、rifampicin投与終了4日後においても、経口投与したmidazolamのAUCは投与前の値の13%と、著しく減少したことを報告している⁵¹⁾。従って、彼らはrifampicinのCYP誘導作用による相互作用のリスクは、少なくとも治療中止後4日目まで持続し、特にCYP3Aの有意な誘導作用はrifampicin投与終了後1-2週間持続すると結論づけている。本章の結果が

ら CYP3A4 活性の回復半減期は 19.9 時間と算出された。これらの知見は、rifampicin により誘導された CYP3A4 活性が rifampicin 投与終了後も持続することを示しており、rifampicin と CYP3A4 基質との薬物相互作用は、同時投与期間だけでなく rifampicin 投与終了後 1 週間は検討する必要があると考えられる。

Rifampicin 以外の誘導物質によって CYP 酵素誘導の経時変化を調べた報告では、Imai らは基質薬として midazolam を使用し、St. John's wort により誘導された CYP3A 活性の回復時間を検討した⁵⁸⁾。その結果、本章の結果と同じく、St. John's wort の誘導作用は経時的に減少し、投与終了 7 日後に投与前のレベルに戻ったと報告している。さらに、いくつかの *in vitro* 及び *in vivo* の知見から、肝臓及び小腸の CYP3A の分解速度定数はそれぞれ 0.000321/min 及び 0.000481/min と見積もられている⁵⁹⁾。他方、Wang らは肝臓の分解速度定数 (0.0005/min) を用いて CYP3A の分解速度を 23 時間 (範囲: 14–35 時間) と推定している⁶⁰⁾。これらの結果は、本研究における CYP3A4 活性の回復半減期とほぼ一致するものと考えられる。従って、rifampicin により誘導した CYP3A4 活性は酵素の分解に伴い、投与前のレベルに回復すると推定される。

以上、本章の結果から、カクテル試験によって複数の CYP 活性を同時に検討し、rifampicin による各 CYP 誘導作用を評価することができた。さらにカクテル試験を応用し、rifampicin の継続服用中止後の CYP 誘導作用の経時変化を CYP 網羅的に評価することが可能であった。このように、カクテル試験を応用することにより、これまで個別に評価されてきた CYP を介する薬物相互作用を網羅的に評価し、臨床使用されている医薬品のみならず、新規に開発された医薬品においても潜在的な相互作用を明らかにすることができると期待される。

第4章 カクテル試験を用いたグレープフルーツジュースによる CYP 及び有機アニオントランスporter阻害作用の同時解析

第1節 緒言

近年、日本では高齢化が進むと共に健康への関心が高まっており、健康の維持増進や疾患の予防を謳った健康食品の利用が増加している。そのため医薬品同士によるだけでなく GFJ や St. John's Wort といった健康食品や食品と医薬品を併用した場合の相互作用も問題視されるようになった^{27,59,61-63)}。

GFJ はその成分中に含まれる bergamottin、dihydroxybergamottin などの furanocoumarin 類や naringin によって消化管における薬物代謝酵素の CYP3A4 を阻害することにより midazolam 等の抗不安薬やスタチン系薬物等の CYP3A4 基質薬物の血漿中濃度を上昇させることが報告されている⁶⁴⁻⁶⁵⁾。また、多くのカルシウム拮抗薬は GFJ と併用時 C_{max} を 1.1 から 1.4 倍に上昇させることが知られており⁶¹⁾、felodipine の併用時では C_{max} が 2.9 から 4 倍に上昇し、単回投与後の血圧低下を増大させるが、連続投与では影響しないことが報告されている⁶⁶⁾。そのためいくつかのカルシウム拮抗薬の添付文書では GFJ との併用は併用注意となっている。

さらに GFJ は薬物代謝酵素だけでなく消化管に存在する OATP を阻害することが知られてきた¹⁶⁻¹⁹⁾。この場合、 β 遮断薬である celiprolol や抗アレルギー薬である fexofenadine などの薬物を体内に取り込むトランスporterが阻害されるため、薬物の血漿中濃度は低下する。 β 遮断薬である celiprolol は高血圧症治療薬として臨床的に用いられているが、GFJ の併用により血漿中濃度が著しく低下することが報告されている^{17,20-21)}。これは celiprolol が OATP で輸送されることから、OATP の阻害により本薬物の消化管吸収が低下したためだと考えられる。この阻害の原因物質として柑橘類に含まれる naringin や hesperidin が報告されている^{19,67-68)}。

GFJ を服用した後、その阻害作用がどの程度持続するかは臨床的に重要だと考えられるが GFJ の摂取後、CYP3A4 活性は数日まで有意に低下したという報告があるものの、薬物代謝酵素活性阻害の持続時間については十分に明らかにされていない⁶⁹⁻⁷⁰⁾。さらに OATP 阻害作用がどの程度持続するかについては、現在のところ何ら報告はない。

カクテル試験は、複数の CYP 活性評価を網羅的に検討できる試験法であるが、これまでのカクテル試験においては、基質薬は CYP 分子種のみを対象としており、トランスporter活性も同時評価した例がない。

そこで本章では、CYP 及びトランスporter活性を CYP3A4 基質薬として midazolam、OATP 基質薬として celiprolol を用いたカクテル試験を用いて同時評価を試みた。すなわち、CYP と OATP を介する相互作用の同時検出を目的としてカクテル試験を行い、GFJ によるそれらの阻害作用の持続時間を比較検討した。また、両薬物の薬物動態及び celiprolol の薬効（血圧、心拍数）について検討した。

第2節 実験方法

4-2-1. 試薬及び飲料

Celiprolol、pindlol は和光純薬工業株式会社(大阪)から、midazolam は Sigma-Aldrich Co. LLC. (St. Louis, MO, USA) より購入した。臨床試験で使用したセレクトール錠は日本新薬(京都)、ドルミカム注はアステラス製薬(東京)から購入した。GFJ はサンキスト 100% グレープフルーツジュース(森永乳業、東京)を使用した。その他の試薬は全て市販の特級規格品を使用した。

4-2-2. 対象

健康成人男性7名を対象とした。年齢 23.1 ± 0.7 歳、体重 68.1 ± 11.6 kg (平均 \pm 標準偏差)であった。被験者は本試験の目的、方法、予測される効果、自由意思による試験への参加及び同意撤回の任意性などについて十分に説明を受け、文書にて試験への参加に同意した。また、被験者は試験開始1週間前より柑橘類の摂取を禁止した。本試験計画書は浜松医科大学及び静岡県立大学倫理委員会において承認され、ヘルシンキ宣言を遵守して実施した。

4-2-3. 試験方法

被験者は GFJ 200 mL を朝、昼、夕食後1日3回、3日間服用した。GFJ 投与前 (control)、3日間服用終了後 (day 1)、終了3日後 (day 3)、終了7日後 (day 7) に臨床試験を行った。臨床試験において、被験者はセレクトール錠 (celiprolol、100 mg) 及びドルミカム注 (midazolam、15 μ g/kg) をカクテル薬として経口投与した。薬物投与前及び投与後1、2、3、4、6及び8時間において最高・最低血圧と心拍数を測定し、採血を行った。1回採血量7 mLとした。血液より血漿を分離し -80°C で測定まで保存した。

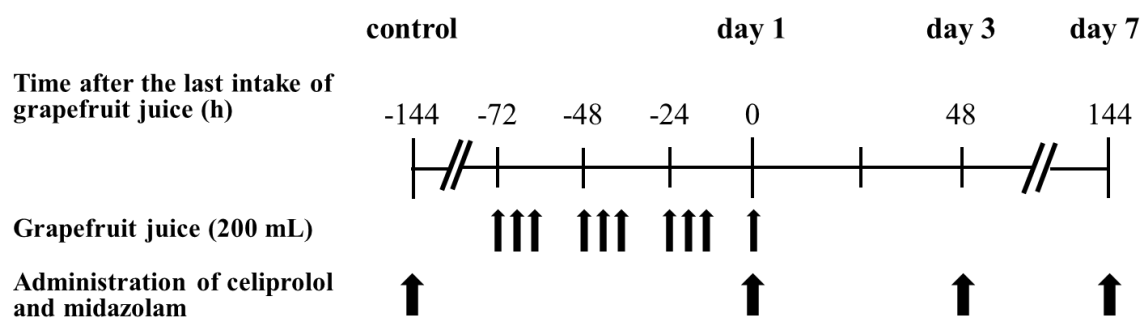


Fig. 14 A scheme of the study design.

4-2-4. 血漿中薬物濃度の測定

4-2-4-1. サンプル前処理方法

血漿 0.3 mL に内部標準物質として pindlol (50 ng) を添加し、0.1% formic acid 300 μ L を加えた。固相抽出 (OASIS HLB μ Elution Plate, Waters, Milford, MA, USA) を行い、acetonitrile 50 μ L、0.1% formic acid 50 μ L で抽出した。抽出液 10 μ L を LC-MS/MS 用試料とした。

4-2-4-2. LC-MS/MS 条件

HPLC は Agilent 社製 1100 LC system を使用した。分離カラムは Cadenza CD-C18 (150 mm \times 2 mm, 3 μ m, Imtakt, 京都) を使用し、プレカラムは Shiseido 社製 CAPCELL PACK C18 MGIII S-5 (10 mm \times 2 mm, 5 μ m) を使用した。カラム温度は 40 $^{\circ}$ C とした。移動相は 0.1% formic acid 及び acetonitrile (65:35) を用い、測定時間を 5 分とした。流速は 0.2 mL/min とした。

質量分析機は API 3000 systems を使用した。標的化合物は Electro Spray Ionization 法により陽イオン化させた。Celiprolol、midazolam の transition (m/z) は各々 380 \rightarrow 251、326 \rightarrow 291、CE (eV) は各々 29、20 とした。Celiprolol 及び midazolam の検量線は 1-10000 ng/mL の範囲で作成し $1/x^2$ で補正した。全ての薬物濃度における相対誤差及び変動係数は 15.9% 及び 10.1% 以下であった。

4-2-5. データ解析

データは平均値 \pm 標準偏差で表示した。AUC は台形法で求め、統計解析には統計解析は GraphPad Prism software (version 5.0) を用いた。Celiprolol 及び midazolam 投与群間の薬物動態学的パラメータの統計学的有意差の判定は、wilcoxon の符号順位和検定を行った。Contorol 群を基準とし、day 1、day 3 及び day 7 を比較したため、合計 3 回の検定を行った。全ての統計学的解析において、bonferoni 補正により危険率 1.7%未満を有意差ありと判定した。

第3節 実験結果

4-3-1. Celiprolol の血漿中濃度推移

薬物投与後、celiprolol の血漿中濃度は全ての投与日において3時間で最高値を示した (Fig. 15)。Celiprolol の血漿中濃度はカクテル薬投与後8時間においても検出され (63.9 ng/mL)、完全に消失しなかった。GFJ 摂取直後の day 1 において、celiprolol の血漿中濃度は著しく低下した (Fig. 15A)。Celiprolol の C_{max} 及び AUC_{0-8h} は、control 期と比較して day 1 ではそれぞれ 18% 及び 25% に有意に低下し、day 3、day 7 では有意な変化は認められなかった (Table 9)。GFJ 最終摂取後 48 時間及び 144 時間である day 3、day 7 では AUC_{0-8h} は control 期まで回復した (Fig. 16)。

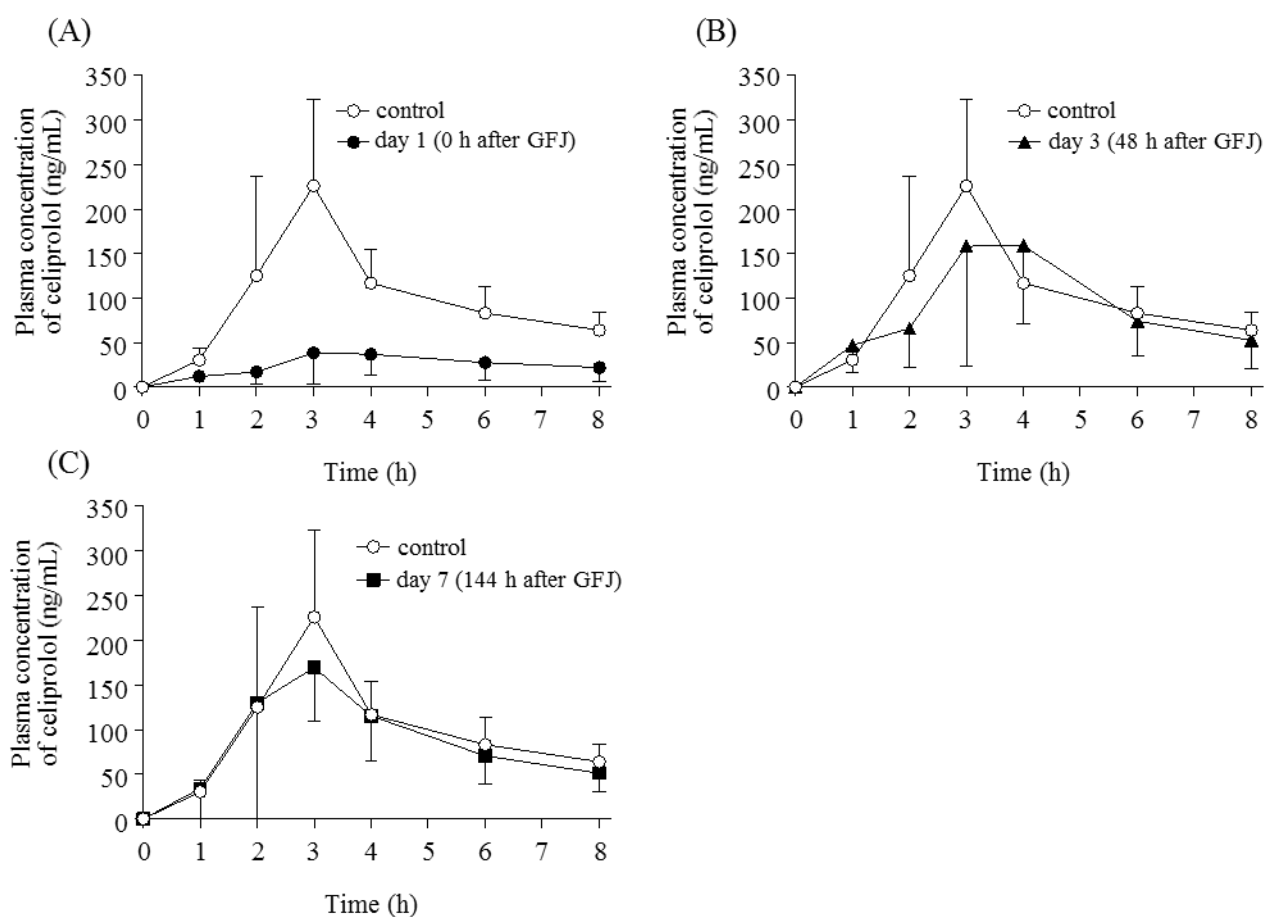


Fig. 15 Time profiles of the plasma concentrations of celiprolol after oral administration on the control day, and days 1 (A), 3 (B), and 7 (C). Each point represents as the mean \pm SD.

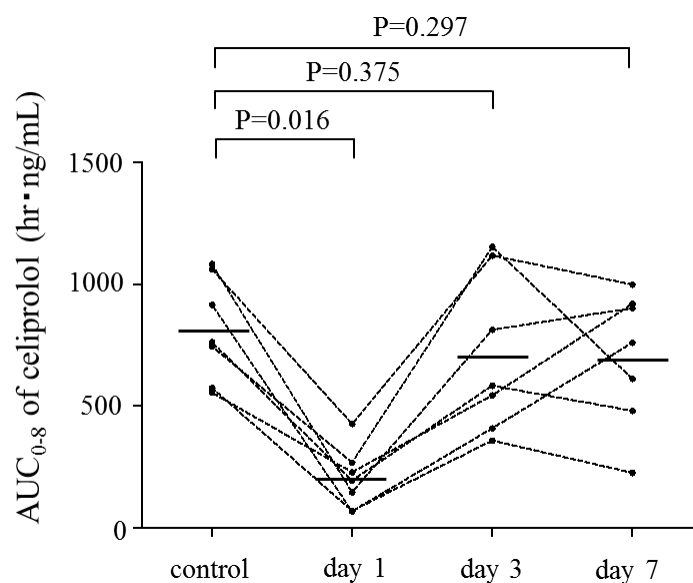


Fig. 16 AUC_{0-8h} values for celiprolol on the control day, and days 1, 3, and 7.

The horizontal line in each column indicates the mean of individual AUC_{0-8h} values.

Table 9 Pharmacokinetic parameters of celiprolol and midazolam after oral administration on the control day and days 1, 3, and 7.

Pharmacokinetic parameters	control	day 1	day 3	day 7
Celiprolol				
AUC _{0-8h} (ng·h/mL)	814 ± 214	200 ± 125	711 ± 324	700 ± 277
ratio vs. control	—	0.251 ± 0.142*	0.881 ± 0.358	0.872 ± 0.390
C _{max} (ng/mL)	259 ± 83.5	46.0 ± 32.8*	219 ± 126	225 ± 104
ratio vs. control	—	0.181 ± 0.106*	0.899 ± 0.579	0.920 ± 0.522
T _{max} (h)	2.57 ± 0.572	2.86 ± 1.07	3.43 ± 0.787	2.86 ± 0.690
ratio vs. control	—	1.14 ± 0.513	1.36 ± 0.339	1.17 ± 0.385
Midazolam				
AUC _{0-8h} (ng·h/mL)	11.3 ± 6.18	22.9 ± 13.8	16.9 ± 9.63	15.1 ± 10.5
ratio vs. control	—	2.12 ± 0.758	1.47 ± 0.440*	1.33 ± 0.450
C _{max} (ng/mL)	4.47 ± 2.56	7.56 ± 3.80	6.82 ± 3.36*	5.15 ± 2.87
ratio vs. control	—	2.12 ± 1.21	1.64 ± 0.694*	1.30 ± 0.599
T _{max} (h)	1.14 ± 0.378	1.14 ± 0.378	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
ratio vs. control	—	1.07 ± 0.450	0.929 ± 0.189	0.929 ± 0.189

The parameters are expressed as means ± SD.

*P < 0.0167 compared to control.

4-3-2. Midazolam の血漿中濃度推移

薬物投与後、midazolam の血漿中濃度は全ての投与日において 1 時間で最高値を示し、以後経時的に減少した (Fig. 17)。Day 1 及び day 3 における midazolam の血漿中濃度は、control 期に比べて著しく高値を示し (Fig. 17A, B)、 AUC_{0-8h} はそれぞれ 2.1 倍及び 1.5 倍に増加した (Table 9)。 AUC_{0-8h} は、GFJ 最終摂取後 144 時間である day 7 において control レベルに回復する傾向が見られた (Fig. 18)。同様に、midazolam の C_{max} も day 1 及び day 3 でそれぞれ 2.1 倍及び 1.6 倍に上昇し、day 7 に回復する傾向が見られた (Table 9)。また T_{max} はいずれも有意な変化は認められなかった (Fig. 17, Table 9)。

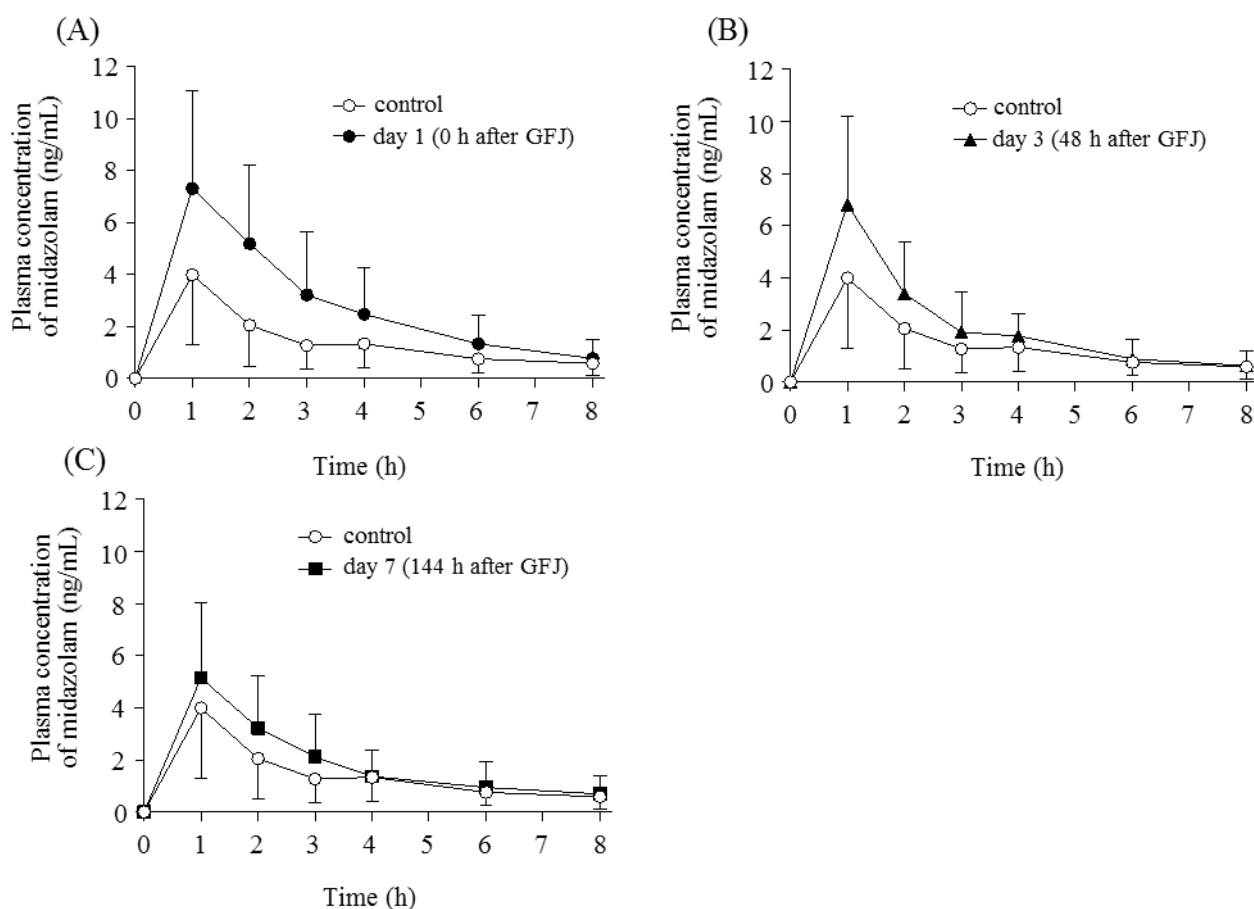


Fig. 17 Time profiles of the plasma concentrations of midazolam (A, B, and C) after oral administration on the control day, and days 1 (A), 3 (B), and 7 (C). Each point represents as the mean \pm SD.

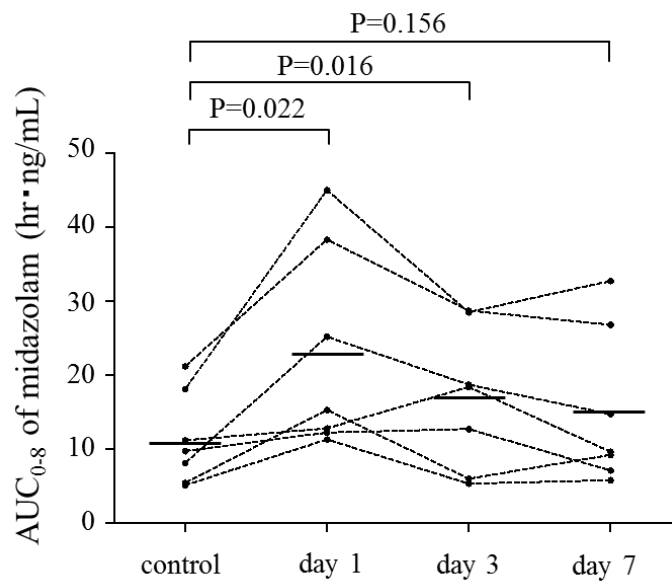


Fig. 18 AUC_{0-8h} values for midazolam on the control day, and days 1, 3, and 7.
The horizontal line in each column indicates the mean of individual AUC_{0-8h} values.

4-3-3. GFJ 併用による薬効の変動

GFJ の影響が最も大きかった day 1 において、薬物投与後、midazolam 及び celiprolol の T_{\max} である 1 時間後、3 時間後の最高・最低血圧及び心拍数の変化率を control 期と比較した。その結果、Day 1 の薬物投与 1 時間後の最高血圧及び心拍数の減少率は、control と比較して 50% 低下したが、有意な差は認められなかった(Fig. 19)。

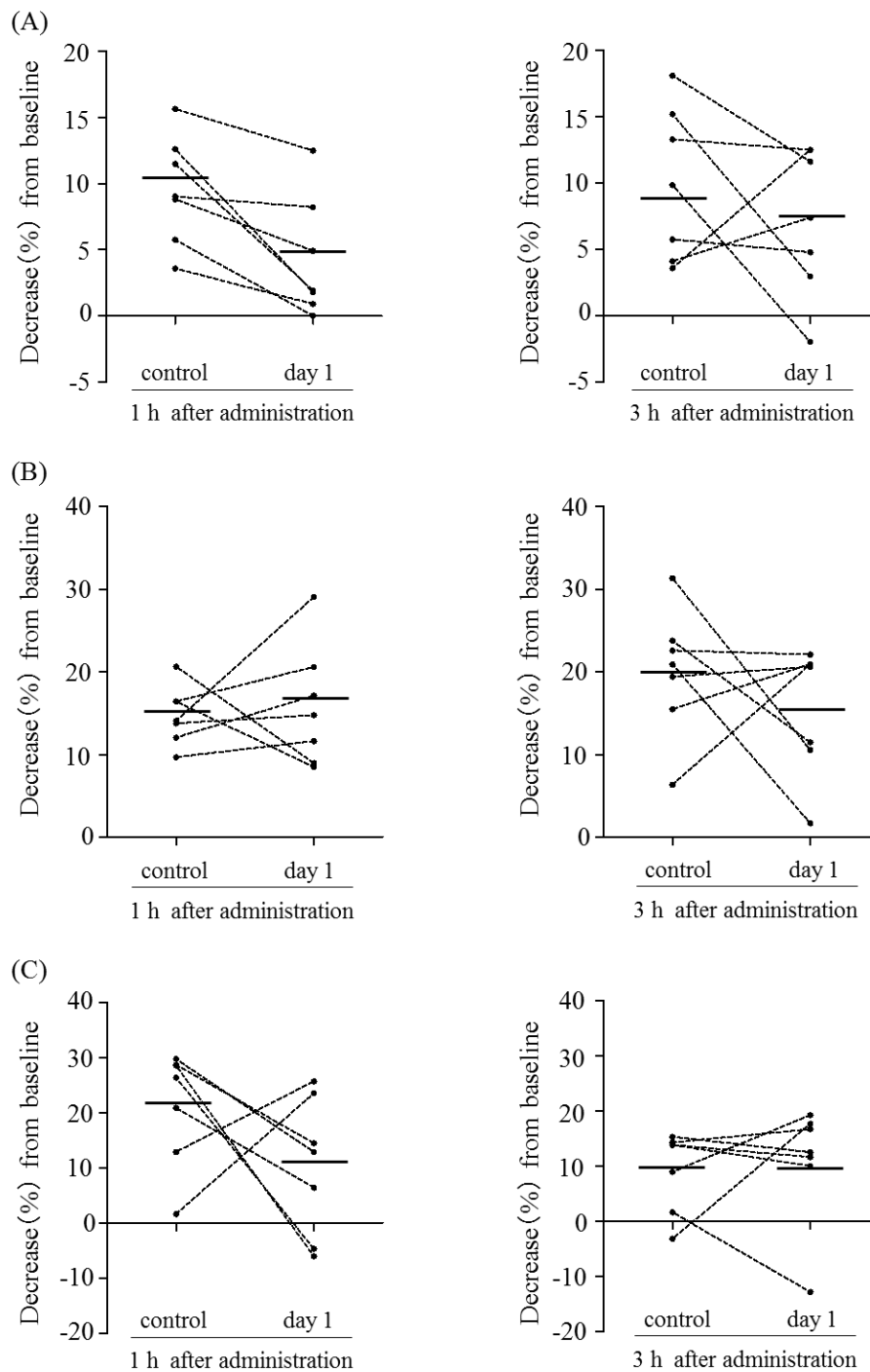


Fig. 19 Percent changes in systolic blood pressure (A), diastolic blood pressure (B), and heart rate (C) 1 and 3 h after drug administration on day 1 and control day compared to the values prior to administration of celiprolol and midazolam (baseline). The horizontal line in each column indicates the mean.

第4節 考察

これまでのカクテル試験は、基質を CYP 分子種に限定している事が多く、トランスポーター活性を同時評価した報告がなかった。そこで、CYP 及び OATP 活性の同時評価を目的として健康成人を対象としたカクテル試験を行い、GFJ によるそれらの阻害作用の持続時間を比較検討した。

被験者に GFJ を 1 日 3 回、3 日間投与後、GFJ 最終投与後 0, 48, 144 時間後である day 1、day 3 及び day 7 に OATP 基質の celiprolol 及び CYP3A4 基質の midazolam を経口投与し、カクテル試験を行った。その結果、GFJ は celiprolol の C_{\max} 及び AUC_{0-8h} を著しく低下させた。これは GFJ の服用により OATP が阻害され、celiprolol の吸収が低下したためと考えられる。Celiprolol の C_{\max} 及び AUC_{0-8h} は GFJ 最終摂取後 48 時間後である day 3 に control レベルに回復した。一方、midazolam の血漿中濃度は day 1、day 3 で control 期と比較して高い値となり、 AUC_{0-8h} もそれぞれ 2.0 倍及び 1.4 倍に上昇したが、day 7 では有意な差は見られなかった。

GFJ による CYP3A4 阻害作用は、可逆的及び非可逆的(mechanism-based)両方のメカニズムによると報告されている⁶⁹⁾。この非可逆的阻害が、CYP3A4 阻害作用が GFJ 投与後も持続した理由と考えられる。また CYP3A4 阻害は、simvastatin、midazolam 及び triazolam による研究で 3-7 日間持続したと報告されており^{58, 71)}、本章の結果と一致する。

GFJ による OATP 阻害作用は、小腸に発現している OATP1A2 及び OATP2B1 活性阻害によると報告されている。OATP については、fexofenadine 投与 4 時間前に GFJ を服用しても影響がみられなかったという報告があるのみで⁷²⁾、阻害持続時間や阻害からの回復過程を評価した報告はなかった。本章では、GFJ による OATP 阻害作用は 48 時間以内という、CYP3A4 阻害作用よりも短時間で回復することを明らかにした。ごく最近 Shirasaka らは、OATP 発現細胞を用いた *in vitro* の研究で GFJ の OATP 阻害作用は可逆的であると報告している⁷³⁾。この報告は、本章の結果を裏付けるものである。

これまでに健康成人を対象とした臨床試験で、GFJ 投与により celiprolol の AUC_{0-8h} が 13% あるいは 17% に減少したと報告されている^{17, 21)}。これらの結果は、今回認められた AUC 低下率よりも大きい。これらの報告では被験者に celiprolol を投与後、GFJ を 200-400 mL 追加投与しており、本章で行った臨床試験よりも GFJ の投与量が多い。これらの結果を考え合わせると、GFJ による阻害作用は、用量依存的であると示唆される。

GFJ による celiprolol の血漿中濃度低下は、OATP 阻害作用が主な原因であると考えられるが、他の要因もいくつか挙げられる。すなわち、GFJ により十二指腸内の pH が低下し、同時投与した celiprolol がイオン型となることで、吸収が低下した可能性や、P 糖タンパク質を介した排出輸送及び物理化学的要因など、他の要因が関与している可能性は否定できない²⁰⁾。

また、本研究では薬物の体内動態の変化だけでなく、薬効にも注目した。 β 遮断薬である celiprolol は高血圧症や狭心症の治療に用いられ、降圧作用を示す。GFJ 併用による OATP 阻害作用が celiprolol の体内動態だけでなく薬効に与える影響について検討するため、celiprolol の薬効として血圧及び心拍数の減少に注目した。薬物投与前及び投与後 1, 2, 3, 4, 6 及び 8 時間において最高・最低血圧及び心拍数を測定し、薬物投与前値からの減少率を算出した。そ

の結果、celiprolol の AUC_{0-8h} が最も低下し、GFJ の影響が最も大きかった day 1 において、midazolam と celiprolol の T_{max} である薬物投与後 1 時間及び 3 時間の値を control 期と比較したところ、投与 1 時間後の最高血圧及び心拍数の減少率は、control と比較して 50% 低下したが有意な差は認められなかった。この結果は、GFJ による celiprolol の吸収低下によるものと推察されるが、被験者数が限られており、元来 celiprolol の血圧及び心拍数減少作用が比較的弱いことなどから、断定はできない。

以上、カクテル試験は OATP 活性評価にも応用可能であり、GFJ による OATP 阻害作用は CYP3A4 よりも短時間で回復することが明らかとなった。よって、OATP 及び CYP3A4 の基質薬による薬物治療を行う際は GFJ の日常的な服用は避けるべきである。本研究における結果は薬物相互作用回避のための情報として有用だと考えられる。

総括

CYP は様々な分子種が存在し、臨床上使用されている薬物の代謝に深く関わっている。また、近年では代謝だけでなく吸収過程による薬物相互作用も注目されている。特にトランスポーターはその発現や機能に個体差が存在する場合、薬物の吸収性が変動し血中濃度や薬効に影響を与えると考えられる。CYP やトランスポーターの代謝活性は遺伝子多型や性別、病態あるいは併用薬などの要因より変動することが知られている。そのためこれらの活性を評価することは、その変動要因及び影響を明らかにし、適切な薬物療法を行う上で重要な情報を与えると考えられる。現在までにヒト肝ミクロソームやヒト組織などを用いた試験や動物を用いた代謝活性評価が行われているが、薬物の吸収、分布、代謝、排泄などの体内動態による影響や酵素活性の種差などにより、これらの試験はヒトにおける活性を完全には反映できない。そのためヒトを対象とした試験が不可欠である。

カクテル試験は、代謝酵素やトランスポーターの複数の基質薬を混合した「カクテル薬」を被検者に投与し、その薬物動態を検討することにより一度に複数の CYP 及びトランスポーター活性を評価できる試験法である。しかし既報のカクテル試験は、基質毎に複数の前処理及び測定を行う必要がある。また、実験動物に応用した報告がほとんどないため、臨床試験が必須である。加えて、カクテル試験を用いて実際に併用薬や食品との薬物相互作用を解析した報告は少なく、基質薬も CYP 分子種のみを対象としており、トランスポーター活性も同時評価した例は少ない。そこで本研究では、まずカクテル薬及びその主代謝物の同時定量法を構築した。次に、新たな薬物相互作用スクリーニング法としてラットを対象としたカクテル試験が応用可能か検討した。さらに、健康成人を対象とした臨床試験を行い、併用薬や食品による CYP 及びトランスポーター活性変動を網羅的かつ経時的に評価した。以上から、カクテル試験を用いた薬物相互作用の網羅的解析法を確立し、応用することを目的とした。

本研究では、まず迅速で簡便なカクテル試験を確立することを目的として、単一の前処理法による 5 種の CYP 基質薬物 (caffeine、losartan、omeprazole、dextromethorphan、midazolam) とその主代謝物の LC-MS/MS における同時定量法の検討を行った。その結果、血漿及び尿中薬物濃度の検量線は良好な直線性を示し、定量における相対誤差及び変動係数は全ての化合物において血漿サンプルは 15% 以下、尿サンプルは 16% 以下であった。また、健康成人 4 名を対象としてカクテル試験を行った結果、カクテル薬投与後の血漿中濃度推移から AUC 及び代謝比 (薬物/代謝物) が算出され、5 種の CYP 活性の解析が可能であった。したがって、ヒトカクテル試験において、本法により全ての基質薬の薬物動態が解析でき、CYP 活性の評価が可能であると考えられた。

次に、カクテル試験を実験動物に応用可能か検討を行った。雄性 SD 系ラット (7-9 週齢) にカクテル薬を経口投与後、経時的に採血し、血漿中薬物及び主要代謝物濃度を測定した。さらにヒトで CYP 阻害作用が報告されている ketoconazole (10 mg/kg)、fluconazole (10 mg/kg) 及び fluvoxamine (100 mg/kg)、ないし CYP 誘導作用が報告されている dexamethasone (80 mg/kg) を前投与して同様に実験を行った。その結果、ラットを用いたカクテル試験におい

て、基質薬物の薬物動態学的パラメータを同時に算出可能であり、また CYP 阻害薬及び誘導薬による CYP 活性の変動を網羅的に検出可能であることが明らかになった。以上の結果から、ラットを用いてカクテル試験を行うことにより、CYP 活性を網羅的に評価可能であることが明らかになった。本法はラットを用いた簡便な薬物相互作用検出法であり、効率的な相互作用スクリーニング法として期待される。尿検体による CYP 活性評価の検討及びヒトへの応用を目指して、CYP 阻害薬あるいは誘導薬の種類を増やして本法により検討し、どの程度までヒトの結果を反映するかを検討する必要がある。

これまでのカクテル試験は基質薬の単剤投与の場合とカクテル薬投与の場合の血漿中薬物濃度推移の変動や薬物動態パラメータの変動について検討しているものが多く、代謝酵素の誘導・阻害の影響を検討した報告はほとんどない。そこで、健康成人を対象としたカクテル試験を行い、CYP 誘導作用が報告されている rifampicin による CYP 活性の変動を経時的に評価した。被験者は rifampicin (450 mg) を 1 週間服用し、rifampicin 投与前 (control) 及び投与終了直後 (day 1)、投与終了 3 日後 (day 4)、投与終了 7 日後 (day 8) にカクテル薬 (caffeine、losartan、omeprazole、dextromethorphan、midazolam) を経口投与し、各薬物とその主代謝物の血漿中濃度を測定した。カクテル薬投与後の血漿中濃度推移から AUC 及び代謝比 (薬物/代謝物) が算出され、5 種の CYP 活性の解析が可能であった。また rifampicin による誘導作用は day 4 まで持続した。以上の結果から、カクテル試験により網羅的かつ経時的に CYP 活性の変動を評価できることが明らかになった。

さらに CYP とトランスポーターを介する相互作用の同時検出を目的として、健康成人を対象としたカクテル試験を行った。GFJ は消化管における CYP3A4 を阻害し、基質薬物の血漿中濃度を上昇させるが、同時に OATP を阻害し、基質薬物の吸収を低下させることが報告されている。本研究では、この相互作用に着目し、GFJ による CYP 及び OATP 阻害作用の持続時間を比較検討した。健康成人 7 名を対象に OATP の基質である celiprolol 100 mg 及び CYP3A4 の基質である midazolam を 15 µg/kg を投与した。投与後 8 時間まで経時的に採血及び血圧、心拍数の測定を行い、両薬物の血漿中薬物濃度を測定した。その後 3 日間 GFJ を毎食後 200 mL 服用し、試験 1 日目に GFJ と共に両薬剤を経口投与した。さらに試験 3 及び 7 日目にも同様の試験を行った。本試験は浜松医科大学倫理委員会の承認を得て行った。両薬物の血中濃度推移から薬物濃度パラメータを算出したところ、celiprolol は試験 1 日目で C_{max} と AUC_{0-8h} が有意に低下しており、3 及び 7 日目では両パラメータに有意な変化が見られなかった。また midazolam は試験 1 及び 3 日目では AUC_{0-8h} は著しく上昇した。しかし、試験 7 日目では AUC_{0-8h} に有意な変化は見られなかった。これにより、カクテル試験は OATP 活性評価にも応用可能であり、GFJ の OATP 阻害作用は 48 時間以内に回復し、CYP3A4 の阻害作用は 144 時間以内に回復することが示唆された。これは薬物相互作用回避のための情報として有用だと考えられる。また、celiprolol の薬効である血圧及び心拍数は有意な変化は見られなかった。

以上、本研究では、迅速かつ簡便なカクテル試験の同時定量法及びラットにおけるカクテル試験を確立した。さらに、実際に併用薬や食品による CYP 及びトランスポーター活性変動を網羅的かつ経時的に解析できることが明らかになった。本研究におけるカクテル試験を用いた薬物相互作用の網羅的解析法は、医薬品の開発及び臨床現場における適切な薬物療法

のいずれに対しても重要な情報を与えると期待される。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院 並木徳之教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を進めるにあたり、親身なるご指導を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院 内田信也准教授に深く感謝致します。

本論文のご高覧と、ご指導及びご助言を賜りました静岡県立大学副学長、大学院薬学研究院 奥直人教授、静岡県立大学大学院薬学研究院 山田静雄教授、ならびに静岡県立大学薬学部副薬学部長、大学院薬学研究院 賀川義之教授に心より感謝致します。

さらに、本研究の遂行にあたり、多くのご助言ならびにご協力を頂きました浜松医科大学臨床薬理学講座 渡邊裕司教授、竹内和彦准教授、乾直輝准教授、宮川幸子博士、影山美智代氏ならびに静岡県立大学薬学部実践薬学分野の学生諸氏に厚く感謝の意を表します。特に、深井幸恵、三浦基靖、山村昌紀、桜田なつきの諸氏には、実験及び論文作成において多大なるご協力を頂きました。本当にありがとうございました。

最後に、研究遂行中及び論文執筆中に公私にわたり、様々な場面でお世話になった皆様に心より感謝致します。

参考文献

- 1) 日本の将来推計人口 (平成 25 年 1 月推計、国立社会保障・人口問題研究所)
- 2) 平成 24 年社会医療診療行為別調査結果 (厚生労働省)
- 3) Gold RM, Mabee J, Chan L, Wong S. Drug-drug and drug-disease interactions in the ED: analysis of a high-risk population. *Am J Emerg Med*, 14, 447-450 (2006).
- 4) Kohler GI, Bode-Boger SM, Busse R, Hoopmann M, Welte T, Boger RH. Drug-drug interactions in medical patients: effects of in-hospital treatment and relation to multiple drug use. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 38, 504-513 (2000).
- 5) 加藤隆一. 臨床薬物動態学 p. 173 (2009), (南江堂)
- 6) Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, Ball SE. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos*, 32, 1201-1208 (2004).
- 7) 千葉寛: チトクローム P450 を介した薬物相互作用. *ファルマシア*. 31, 992-996 (1995).
- 8) Michalets EL. Update: Clinically significant cytochrome P-450, drug interactions. *Pharmacotherapy*, 18, 84-112 (1998).
- 9) Nebert, DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, 360, 1155-1162 (2002).
- 10) Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2, 875-894 (2006).
- 11) Gorski JC, Vannaprasaht S, Hamman MA, Ambrosius WT, Bruce MA, Haehner-Daniels B, Hall SD. The effect of age, sex, and rifampin administration on intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 74, 275-287 (2003).
- 12) Bebia Z, Buch SC, Wilson JW, Frye RF, Romkes M, Cecchetti A, Chaves-Gnecco D, Branch RA. Bioequivalence revisited: influence of age and sex on CYP enzymes. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 76, 618-627 (2004).
- 13) Graham DJ, Staffa JA, Shatin D, Andrade SE, Schech SD, La Grenade L, Gurwitz JH, Chan KA, Goodman MJ, Platt R. Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs. *JAMA*, 292, 2585-2590 (2004).
- 14) Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol*, 12, 1-51 (1993).
- 15) Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med*, 352, 2211-2221 (2005).
- 16) Dresser GK, Bailey DG, Leake BF, Schwarz UI, Dawson PA, Freeman DJ, Kim RB. Fruit juices

- inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 71, 11–20 (2002).
- 17) Lilja JJ, Backman JT, Laitila J, Luurila H, Neuvonen PJ. Itraconazole increases but grapefruit juice greatly decreases plasma concentrations of celiprolol. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 73, 192–198 (2003).
 - 18) Lilja JJ, Raaska K, Neuvonen PJ. Effects of grapefruit juice on the pharmacokinetics of acebutolol. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 60, 659–663 (2005).
 - 19) Bailey DG, Dresser GK, Leake BF, Kim RB. Naringin is a major and selective clinical inhibitor of organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) in grapefruit juice. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 81, 495–502 (2007).
 - 20) Kato Y, Miyazaki T, Kano T, Sugiura T, Kubo Y, Tsuji A. Involvement of influx and efflux transport systems in gastrointestinal absorption of celiprolol. *J Pharm Sci.* 98, 2529–2539 (2009).
 - 21) Ieiri I, Doi Y, Maeda K, Sasaki T, Kimura M, Hirota T, Chiyoda T, Miyagawa M, Irie S, Iwasaki K, Sugiyama Y. Microdosing clinical study: pharmacokinetic, pharmacogenomic (SLCO2B1), and interaction (grapefruit juice) profiles of celiprolol following the oral microdose and therapeutic dose. *J. Clin. Pharmacol.*, 52, 1078–1089 (2012).
 - 22) Streetman DS, Bleakley JF, Kim JS, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A, Gotschall R, Kearns GL, Bertino JS Jr. Combined phenotypic assessment of CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase with the "Cooperstown cocktail". *Clin. Pharmacol. Ther.*, 68, 375–383 (2000).
 - 23) Chainuvati S, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A, Kearns GL, Sellers E, Zhang Y, Kashuba AD, Rowland E, Bertino JS Jr. Combined phenotypic assessment of cytochrome P450 1A2, 2C9, 2D6 and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase with the "Cooperstown 5+1 cocktail". *Clin. Pharmacol. Ther.*, 74, 437–447 (2003).
 - 24) Christensen M, Andersson K, Dalén P, Mirghani RA, Muirhead GJ, Nordmark A, Tybring G, Wahlberg A, Yaşar U, Bertilsson L. The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 73, 517–528 (2003).
 - 25) Ryu JY, Song IS, Sunwoo YE, Shon JH, Liu KH, Cha IJ, Shin JG. Development of the "Inje cocktail" for high-throughput evaluation of five human cytochrome P450 isoforms in vivo. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 82, 531–540 (2007).
 - 26) Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.*, 75, 3019–3030 (2003).
 - 27) U.S. Food and Drug Administration. "Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation": < <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf> > cited May, 2001.
 - 28) Adaway JE, Keevil BG. Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 883–884, 33–49 (2012).
 - 29) Misaka S, Uchida S, Imai H, Inui N, Nishio S, Ohashi K, Watanabe H, Yamada S.

- Pharmacokinetics and pharmacodynamics of low doses of midazolam administered intravenously and orally to healthy volunteers. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 37, 290-295 (2010).
- 30) Oh KS, Park SJ, Shinde DD, Shin JG, Kim DH. High-sensitivity liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of five drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 895-896, 56-64 (2012).
 - 31) Tucker GT, Houston JB, Huang SM. Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential-toward a consensus. *Clin Pharmacol Ther*, 70, 103-114 (2001).
 - 32) Uchida S, Yamada H, Li XD, Maruyama S, Ohmori Y, Oki T, Watanabe H, Umegaki K, Ohashi K, Yamada S. Effects of Ginkgo biloba extract on pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolbutamide and midazolam in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.*, 46, 1290-1298 (2006).
 - 33) Huang SM, Temple R, Throckmorton DC, Lesko LJ. Drug interaction studies: study design, data analysis, and implications for dosing and labeling. *Clin Pharmacol Ther*; 81, 298-304 (2007).
 - 34) Kurosawa S, Uchida S, Ito Y, Yamada S. Effect of ursodeoxycholic acid on the pharmacokinetics of midazolam and CYP3A in the liver and intestine of rats. *Xenobiotica*, 39, 162-170 (2009).
 - 35) Vats R, Varanasi KV, Arla R, Veeraraghavan S, Rajak S. Drug-drug interaction study to assess the effects of atorvastatin co-administration on pharmacokinetics and anti-thrombotic properties of cilostazol in male Wistar rats. *Biopharm Drug Dispos*, 33, 455-465 (2012).
 - 36) Zhao P, Zhang L, Grillo JA, Liu Q, Bullock JM, Moon YJ, Song P, Brar SS, Madabushi R, Wu TC, Booth BP, Rahman NA, Reynolds KS, Gil Berglund E, Lesko LJ, Huang SM. Applications of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation during regulatory review. *Clin Pharmacol Ther*, 89, 259-267 (2011).
 - 37) Bouzom F, Ball K, Perdaems N, Walther B. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling tools: how to fit with our needs? *Biopharm Drug Dispos*, 33, 55-71 (2012).
 - 38) Culm-Merdek KE, von Moltke LL, Harmatz JS, Greenblatt DJ. Fluvoxamine impairs single-dose caffeine clearance without altering caffeine pharmacodynamics. *Br J Clin Pharmacol*, 60, 486-493 (2005).
 - 39) Kot M, Daniel WA. Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. *Pharmacol Rep*, 60, 789-797 (2008).
 - 40) Kishimoto W, Takano J, Senda C, Ishiguro N, Sakai K, Igarashi T. Quantitative prediction of in vivo drug interactions between nevirapine and antifungal agents from in vitro data in rats. *Biol Pharm Bull*, 23, 1027-1032 (2000).
 - 41) Misaka S, Kurosawa S, Uchida S, Yoshida A, Kagawa Y, Yamada S. Evaluation of the pharmacokinetic interaction of midazolam with ursodeoxycholic acid, ketoconazole and dexamethasone by brain benzodiazepine receptor occupancy. *J Pharm Pharmacol*, 63, 58-64 (2011).
 - 42) Vuppugalla R, Zhang Y, Chang S, Rodrigues AD, Marathe PH. Impact of nonlinear midazolam

- pharmacokinetics on the magnitude of the midazolam-ketoconazole interaction in rats. *Xenobiotica*, 42, 1058-1068 (2012).
- 43) Nedelcheva V, Gut I. P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica*, 24, 1151-1175 (1994).
 - 44) Morgan ET, MacGeoch C, Gustafsson JA. Hormonal and developmental regulation of expression of the hepatic microsomal steroid 16 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 apoprotein in the rat. *J Biol Chem*, 260, 11895-11898 (1985).
 - 45) Niwa T, Shiraga T, Takagi A. Effect of Antifungal Drugs on Cytochrome P450 (CYP) 2C9, CYP2C19, and CYP3A4 Activities in Human Liver Microsomes. *Biol Pharm Bull*, 28, 1805-1808 (2005).
 - 46) Chang M, Tybring G, Dahl ML, Gotharson E, Sagar M, Seensalu R, Bertilsson L. Interphenotype differences in disposition and effect on gastrin levels of omeprazole-suitability of omeprazole as a probe for CYP2C19. *Br J Clin Pharmacol*, 39, 511-518 (1995).
 - 47) Venhorst J, ter Laak AM, Commandeur JN, Funae Y, Hiroi T, Vermeulen NP. Homology modeling of rat and human cytochrome P450 2D (CYP2D) isoforms and computational rationalization of experimental ligand-binding specificities. *J Med Chem*, 46, 74-86 (2003).
 - 48) Blumberg HM, Burman WJ, Chaisson RE, Daley CL, Etkind SC, Friedman LN, Fujiwara P, Grzemska M, Hopewell PC, Iseman MD, Jasmer RM, Koppaka V, Menzies RI, O'Brien RJ, Reves RR, Reichman LB, Simone PM, Starke JR, Vernon AA. American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention and the Infectious Diseases Society. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 603-662 (2003).
 - 49) Guengerich, F.P. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 1-17 (1999).
 - 50) Fromm, M.F., Busse, D., Kroemer, H.K. Eichelbaum, M. Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampin. *Hepatology* 24, 796-801 (1996).
 - 51) Backman, J.T., Kivistö, K.T., Olkkola, K.T. Neuvonen, P.J. The area under the plasma concentration-time curve for oral midazolam is 400-fold larger during treatment with itraconazole than with rifampicin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 54, 53-58 (1998).
 - 52) Niemi, M., Backman, J.T., Fromm, M.F., Neuvonen, P.J. Kivistö, K.T. Pharmacokinetic interactions with rifampicin: clinical relevance. *Clin. Pharmacokinet.* 42, 819-850 (2003).
 - 53) Christians, U., Jacobsen, W. Floren, L.C. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: are the statins mechanistically similar? *Pharmacol. Ther.* 80, 1-34 (1998).
 - 54) Kanebratt KP, Diczfalussy U, Bäckström T, Sparve E, Bredberg E, Böttiger Y, Andersson TB, Bertilsson L. Cytochrome P450 induction by rifampicin in healthy subjects: determination using the Karolinska cocktail and the endogenous CYP3A4 marker 4beta-hydroxycholesterol. *Clin. Pharmacol. Ther.* 84, 589-594 (2008).

- 55) Williamson, K.M., Patterson, J.H., McQueen, R.H., Adams, K.F. Jr. Pieper, J.A. Effects of erythromycin or rifampin on losartan pharmacokinetics in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 63, 316–323 (1998).
- 56) Vormfelde SV, Brockmöller J, Bauer S, Herchenhein P, Kuon J, Meineke I, Roots I, Kirchheiner J. Relative impact of genotype and enzyme induction on the metabolic capacity of CYP2C9 in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 86, 54–61 (2009).
- 57) Neuvonen, P.J., Niemi, M. Backman, J.T. Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 80, 565–581 (2006).
- 58) Imai H, Kotegawa T, Tsutsumi K, Morimoto T, Eshima N, Nakano S, Ohashi K. The recovery time-course of CYP3A after induction by St John's wort administration. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 65, 701–707 (2008).
- 59) Obach, R.S., Walsky, R.L. Venkatakrishnan, K. Mechanism-based inactivation of human cytochrome p450 enzymes and the prediction of drug-drug interactions. *Drug Metab. Dispos.* 35, 246–255 (2007).
- 60) Wang, Y.H., Jones, D.R. Hall, S.D. Prediction of cytochrome P450 3A inhibition by verapamil enantiomers and their metabolites. *Drug Metab. Dispos.* 32, 259–266 (2004).
- 61) Bailey DG, Malcolm J, Arnold O, Spence JD. Grapefruit juice-drug interactions. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 58, 831–840 (2004).
- 62) Dahan A, Altman H. Food-drug interaction: grapefruit juice augments drug bioavailability--mechanism, extent and relevance. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 58, 1–9 (2004).
- 63) Bailey DG. Fruit juice inhibition of uptake transport: a new type of food-drug interaction. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 70, 645–655 (2010).
- 64) Hanley MJ, Cancalon P, Widmer WW, Greenblatt DJ. The effect of grapefruit juice on drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 7, 267–286 (2011).
- 65) Kakar SM, Paine MF, Stewart PW, Watkins PB. 6'7'-Dihydroxybergamottin contributes to the grapefruit juice effect. *Clin Pharmacol Ther*, 75, 569–579 (2004).
- 66) Dresser GK, Bailey DG, Carruthers SG. Grapefruit juice–felodipine interaction in the elderly. *Clin Pharmacol Ther*; 68, 28–34 (2000).
- 67) Guo LQ, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y. Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition of human CYP3A activity. *Drug. Metab. Dispos.*, 28, 766–771 (2000) .
- 68) Edwards DJ, Bernier SM. Naringin and naringenin are not the primary CYP3A inhibitors in grapefruit juice. *Life Sciences*, 59, 1025–1030 (1996).
- 69) Greenblatt DJ, von Moltke LL, Harmatz JS, Chen G, Weemhoff JL, Jen C, Kelley CJ, LeDuc BW, Zinny MA. Time course of recovery of cytochrome p450 3A function after single doses of grapefruit juice. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 74, 121–129 (2003)
- 70) Culm-Merdek KE, von Moltke LL, Gan L, Horan KA, Reynolds R, Harmatz JS, Court MH, Greenblatt DJ. Effect of extended exposure to grapefruit juice on cytochrome P450 3A activity in humans: comparison with ritonavir. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 79, 243–254 (2006).

- 71) Galetin A, Burt H, Gibbons L, Houston JB. Prediction of time-dependent CYP3A4 drug-drug interactions: impact of enzyme degradation, parallel elimination pathways, and intestinal inhibition. *Drug Metab. Dispos.*, 34, 166-175 (2006).
- 72) Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, Gregor JC, Schwarz UI, McGrath JS, Jolicoeur E, Lee W, Leake BF, Tirona RG, Kim RB. Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 81, 362–370 (2007).
- 73) Shirasaka Y, Shichiri M, Murata Y, Mori T, Nakanishi T, Tamai I. Long-lasting inhibitory effect of apple and orange juices, but not grapefruit juice, on OATP2B1-mediated drug absorption. *Drug Metab Dispos.*, 41, 615-621 (2013).