

博士論文

シトクロム P450 活性及び薬物相互作用の評価を目的とした
臨床試験法に関する研究

本論文は静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府博士論文である

2020年9月

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 薬学専攻

博士課程 実践薬学講座

三浦 基靖

Clinical study for the evaluation of cytochrome P450
activities and drug interactions

September 2020

Motoyasu Miura

略語表

本論文中に用いられる略語及び略記号は以下の通りである。

AUC	Area under the plasma concentration-time curve (血漿中薬物濃度時間曲線下面積)
AUC _{obse}	Observed value of area under the plasma concentration-time curve (血漿中薬物濃度時間曲線下面積の実測値)
AUC _{pred}	Predicted value of area under the plasma concentration-time curve (血漿中薬物濃度時間曲線下面積の予測値)
CE	Collision energy (コリジョンエネルギー)
CL	Clearance (クリアランス)
CL _{obse}	Observed value of clearance (クリアランスの実測値)
CL _{pred}	Predicted value of clearance (クリアランスの予測値)
CL _{total}	Total clearance (全身クリアランス)
CL/F	Oral clearance (経口クリアランス)
CXP	Collision cell exit potential (コリジョンセルイグジット電位)
CYP	Cytochrome P450 (シトクロム P450)
DP	Declustering potential (デクラスタリング電位)
EM	Extensive metabolizers (高活性代謝群)
FDA	Food and Drug Administration (米国食品医薬品局)
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaril coenzima A (3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素 A)
IM	Intermediate metabolizers (中活性代謝群)
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (液体クロマトグラフィータンデム質量分析)
MAE	Mean absolute error (平均絶対誤差)
MPE	Mean prediction error (平均予測誤差)
PM	Poor metabolizers (低活性代謝群)
PT-INR	Prothrombin time-international normalized ratio (プロトロンビン時間国際標準比)
r^2	Coefficients of determination (決定係数)
RMSE	Root mean squared error (平均二乗誤差平方根)
UGT	UDP-glucuronosyltransferases (UDP-グルクロン酸転移酵素)

目次

緒論	1
第1章 健常人におけるmidazolamの1ポイント血漿中濃度及び尿中排泄量を用いたAUC及びクリアランス予測	5
第1節 序論	5
第2節 方法	7
1-2-1 試験方法	7
1-2-2 解析	7
1-2-2-1 薬物動態学的パラメータ解析	7
1-2-2-2 クロスバリデーション法による予測性解析	8
1-2-2-3 統計解析	9
第3節 結果	10
1-3-1 静脈内投与後のmidazolam血漿中濃度とAUCならびに血漿中濃度代謝比と全身クリアランスの関係	10
1-3-2 経口投与後のmidazolam血漿中濃度とAUCならびに血漿中濃度代謝比と経口クリアランスの関係	14
1-3-3 尿中midazolam排泄量とAUCならびに尿中代謝比とクリアランスの関係	18
第4節 考察	19
第2章 定量的薬物相互作用評価のためのカクテル試験の検証	22
第1節 序論	22
第2節 方法	23
2-2-1 試薬	23
2-2-2 カクテル試験	23
2-2-2-1 対象	23
2-2-2-2 試験方法	23
2-2-2-2-1 カクテル薬投与	23
2-2-2-2-2 全体スケジュール（CYP誘導薬及び阻害薬投与方法）	24
2-2-3 基質薬単独投与試験	24
2-2-3-1 対象	24
2-2-3-2 試験方法	25
2-2-3-2-1 基質薬単独投与	25
2-2-3-2-2 全体スケジュール（CYP誘導薬及び阻害薬投与方法）	25
2-2-4 血漿中の薬物及び代謝物濃度測定	27
2-2-4-1 血漿検体の前処理方法	27
2-2-4-2 LC-MS/MS条件	27

2-2-5	文献レビューによるレトロスペクティブ分析	29
2-2-5-1	文献検索	29
2-2-5-2	文献の選択とデータ抽出	29
2-2-6	CYP2C19 の遺伝子多型評価	29
2-2-7	薬物動態学的パラメータ解析	29
2-2-8	データ解析	29
2-2-9	文献報告及び基質薬単独投与試験とカクテル試験の比較	30
第3節	結果	31
2-3-1	カクテル試験による CYP 活性変動評価	31
2-3-2	CYP 基質薬単独投与試験による CYP 活性変動評価	33
2-3-3	文献検索結果	35
2-3-4	文献報告及び CYP 基質薬単独投与試験とカクテル試験の比較	36
第4節	考察	40
第3章	カクテル試験での1ポイント採血における血漿中濃度と AUC 及び 血漿中濃度代謝比と経ロクリアランスの関係	43
第1節	序論	43
第2節	方法	44
3-2-1	試験方法	44
3-2-2	血漿中の薬物及び代謝物濃度測定	44
3-2-3	薬物動態学的パラメータ解析	44
3-2-4	クロスバリデーション法による予測性解析	44
3-2-5	統計解析	44
第3節	結果	45
3-3-1	各基質薬の血漿中濃度と AUC の関係	45
3-3-2	各基質薬の血漿中濃度代謝比と経ロクリアランスの関係	52
3-3-3	1ポイント採血の最適ポイントの検証	58
第4節	考察	62
総括		65
謝辞		67
参考文献		68

緒論

薬物代謝に関与する酵素ファミリーであるシトクロム P450 (CYP) は臨床的に使用されている多くの薬物や生体異物の第 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。CYP は酸素の活性化に伴う薬物の酸化反応や水酸化、アルキル化、還元、開環反応などに関与することが知られている¹⁾。また CYP には複数の分子種が存在し、アミノ酸配列の違いにより分類され、相同性が 40% 未満のものを異なるファミリーとし、CYP1、CYP2、CYP3 のように分類され、主に薬物代謝に関与するものは CYP1、2、3 である^{2,3)}。そして、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類される。

ヒト肝臓ミクロソーム中には Table 1 に示す割合で CYP が存在し、代表的な CYP 分子種として CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A がある^{3,4,5)}。CYP で代謝される薬物のうち最も多くの医薬品代謝に CYP3A が関与し、2D6 の関与も高いことが報告されている^{1,6,7)}。また CYP3A には代謝に大きく関与している CYP3A4 と 3A5 があり、この 2 つの酵素の基質認識性は類似する。このため CYP3A で代謝される薬物は CYP3A4 及び 3A5 の基質となることが多い^{8,9)}。

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。さらにこれらの CYP 活性は遺伝子多型や併用薬など様々な要因により変動し、薬物の体内動態に大きな変化をもたらすことで、薬物治療効果や有害作用発現に影響を与えることがある^{10,11)}。このため CYP 活性変動の解析は医薬品開発及び適切な薬物治療実施のために有用な情報を与えると考えられる。

CYP 活性変動が生じることで薬物相互作用が引き起こされることが知られている。薬物動態学的相互作用は薬物の吸収、分布、代謝、排泄の過程において生じ、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¹²⁾。薬物相互作用に関して調査した報告によると、薬物動態学的相互作用の 37% が代謝部位で起きており、その代謝過程における相互作用の約 96% に CYP が関与していると推測されている¹³⁾。また、これまでも多くの CYP を介した薬物相互作用が各国で報告されている^{5,14-21)}。例えば warfarin と miconazole の併用により warfarin の効果が増強、プロトロン時間 (PT-INR) の延長が生じた。中には PT-INR が 10 以上又は測定不能になる症例や重篤な出血を引き起こした症例も報告されている¹⁵⁾。この warfarin の効果増強は、miconazole の CYP2C9 阻害作用が原因だと考えられており、厚生労働省は 2016 年 10 月、miconazole と warfarin を併用禁忌とするよう添付文書の改訂を指示した¹⁵⁾。また 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素 A (HMG-CoA) 還元酵素阻害薬である lovastatin、simvastatin、atorvastatin は CYP3A4 阻害薬との相互作用により、横紋筋融解症発症リスク上昇が認められた¹⁶⁻¹⁸⁾。このように薬物相互作用によって治療効果が減弱するだけでなく、重篤な副作用が発現する恐れがあり、治療の成功を困難にすることがある。このため医薬品開発においても、製品開発の段階で相互作用情報を収集し、新規医薬品の情報として医療現場に提供することは重要である。また薬剤師は、相互作用情報を含めた薬剤情報、患者情報、併用薬などの治療に関する情報を総合的に評価することで、安全で有効な薬物治療の実施に貢献することが重要な使命の一つである。製品の薬物相互作用

Table 1 The relative levels (percent of total cytochrome P450(CYP)) of individual forms of CYP in human liver microsome and the percentage of CYP involved in drug metabolism.^{4,7)}

	Relative levels in liver microsome	Percentage involved in drug metabolism
CYP1A2	12.7 %	4.3 %
CYP2B6	0.2 %	—
CYP2C	22.2 %	21.2 %
CYP2D6	1.5 %	33.0 %
CYP2E	6.6 %	—
CYP3A	28.8 %	37.2 %
Others	28.0 %	4.3 %

用情報が十分であれば、臨床現場での相互作用を起こす薬剤併用リスクは低下し、重篤な副作用発現を回避できると考えられる。また高齢者のポリファーマシーも近年注目されており、使用薬剤の増加に伴い、薬剤関連有害事象発現頻度が増加するとの報告もある²²⁾ (Table 2)。さらに平成 26 年 (2014 年) からは一般用医薬品のインターネット販売規制が緩和され、インターネットでほぼ全ての一般用医薬品が入手可能になった^{23,24)}。また近年の健康志向の高まりに伴い健康食品の利用も増加している。東京都の調査では 66.4%の人が健康食品を利用していたと報告された²⁵⁾。このように多くの人が一般用医薬品、健康食品を容易に使用できる環境下であることを考慮すると、医療用医薬品間の相互作用のみではなく、セルフメディケーションにおける薬物相互作用も看過できない問題となっている。このため相互作用評価の重要性はますます高まっている。医薬品開発に関して米国食品医薬品局 (FDA) や欧州医薬品庁 (European Medicines Agency) はガイダンス (2017 年) やガイドライン (2015 年) を発出しており、日本においても「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」(2018 年) が発出されている²⁶⁻²⁸⁾。それぞれのガイドラインでは薬物相互作用により患者に不利益が生じないように、医薬品開発の段階で生じる可能性のある薬物相互作用の性質とその程度を適切に評価することが重要であることが述べられている。またガイダンスにおいては新薬と相互作用を起こす可能性のある併用薬を使用する患者に対し、新薬を投与する前に薬物相互作用を評価するための試験を行うことを推奨している²⁶⁾。このように CYP 活性や潜在的な薬物相互作用を臨床試験によって評価することは重要である。

通常、CYP 活性や薬物相互作用を評価する方法として、まず動物やヒトの肝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が行われる²⁹⁻³²⁾。しかしながら、*in vitro* 試験や動物試験では、体内動態などの要因欠如や種差により、これらの結果を臨床現場に直接適応できるとは限らない³³⁾。また近年はモデル&シミュレーションという考えが注目されており、*in vitro* データにもとづくモデルを用いた CYP 活性評価や薬物相互作用のリスク検出及び予測が期待されている^{34,35)}。各国のガイドラインにおいてもモデル&シミュレーションは医薬品開発に役立つことを提唱している²⁶⁻²⁸⁾。

Table 2 Impact of polypharmacy; relationship between number of prescription drug and adverse drug event ratio.²²⁾

Number of prescription drug	Adverse drug event rates (%)
1–3 drugs	6.5
4–5 drugs	8.9
6–7 drugs	13.1*
8–9 drugs	11.9*
≥10 drugs	13.9*

* $p < 0.05$ versus one to three drugs.

ヒトを対象とした臨床試験による CYP 活性や薬物相互作用の評価は、通常、単一の CYP 基質薬を用いて、CYP 基質薬の血漿中薬物濃度時間曲線下面積 (AUC) やクリアランス (CL) などの薬物動態パラメータの変動を評価することで行われている³⁶⁻³⁸⁾。また薬物相互作用の程度を分類する場合、各国のガイドラインでは CYP 基質薬の AUC 又は CL 変動の程度を用いて、strong、moderate、weak の 3 段階に分類している²⁶⁻²⁸⁾。このため CYP 基質薬の AUC や CL を評価することは重要である。複数ある CYP 分子種のうち、最も多くの薬物代謝に関与している CYP3A4 の活性変動は薬物治療効果に大きな影響を与えると考えられる。しかしながら CYP 活性評価のために CYP 基質薬を用いて臨床試験を行う場合、基質薬の AUC や CL などの薬物動態を解析するためには頻回採血が必要であり、被験者や患者に大きな負担となる。さらに複数の CYP 活性評価のためには、各 CYP 基質薬を用いた臨床薬物動態試験が必要であり、臨床試験回数や採血回数を増やすこととなり、被験者への負担が大きくなる。

そこで近年、複数の CYP 活性評価や薬物相互作用検出法として注目されているのがカクテル試験である。カクテル試験とは医薬品代謝への関与の高い CYP 分子種の基質となる複数の薬物をカクテル薬として一度に被験者に投与し、CYP 活性評価や薬物相互作用検出を行う手法であり、一度の臨床試験で様々な CYP 分子種の活性評価及び薬物相互作用検出が可能である³⁹⁻⁴⁶⁾。また医薬品開発に関するガイドラインやガイダンスにおいてもカクテル試験による薬物相互作用検出についての記載が追加されており、効率的な臨床試験法として注目を集めている²⁶⁻²⁸⁾。FDA のガイダンスには、適切に実施されたカクテル試験から得られた negative な結果は、特定の CYP 又はトランスポーターとの相互作用を否定でき、positive な結果はその他の適切に実施された薬物相互作用の結果と同様だと考えてよいことが記載されている²⁶⁾。しかし、カクテル試験は複数の CYP 基質薬の評価のために臨床薬物動態試験の回数を減じ、採血頻度を少なくすることができるが、単一基質薬を用いた試験と同数の採血は最小限必要となるため、更なる改善の余地があると考えられる。さらに、これまでのカクテル試験は多くの報告が CYP 基質薬の単独投与とカクテル薬投与 (CYP 基質薬の同時投与) を比較して、各 CYP 基質薬間の相互作用を評価している^{39,40,47)}。このため、CYP 基質薬間の薬物相互作用に関する研究は行われているが、カクテル試験における CYP 誘導薬及び阻害薬併用時の各基質

薬の薬物動態変化が、CYP 基質薬単独投与試験における変化と同等かは不明であり、カクテル試験による定量的な薬物相互作用評価の妥当性が十分に検証されているとは言えない。

これらの臨床薬物動態試験法の問題点から、被験者の負担を軽減した CYP 活性及び網羅的な薬物相互作用を評価できる試験法が必要とされている。各 CYP 基質薬の薬物動態パラメータ算出のための採血回数を減らすことができれば被験者への負担は大きく軽減される。また採血量を少なくした評価や尿検体を用いた評価も被験者への侵襲軽減につながる。これまでに被験者への負担や侵襲を軽減するために採血回数を減らした侵襲性の少ない評価法の開発が試みられてきた^{48,49)}。

実際に CYP3A4 活性評価法として、その代表的な基質薬である midazolam 投与後の採血回数を減らした方法 (limited-point sampling 法) による活性評価が試みられてきたが、1 点採血による CYP3A4 活性評価法は未だに確立されていない⁵⁰⁻⁵³⁾。また midazolam を用いた CYP3A4 活性評価の多くは主に血漿中濃度が用いられており、midazolam の尿中排泄による評価はわずかしが行われていない。尿検体による活性評価は、採血のための穿刺が必要なく、容易に検体回収が行えるため被験者への侵襲性が低い。しかし、これまでの報告からでは尿検体による CYP 活性評価が行えるか定かではなく、尿を用いた活性評価法は確立していない^{50,51,54)}。さらにカクテル試験においても侵襲を少なくするために CYP 基質薬ごとに最適な採血時間や検体について評価を行っているが、全ての基質薬の AUC や CL を 1 点採血で評価できる手法に関する報告は少ない^{42,49,55)}。またカクテル薬を用いて CYP 誘導及び阻害の影響も含めた 1 点採血による AUC 及び CL 予測評価法について検討した報告はない。

そこで本論では、低侵襲的かつ網羅的な CYP 活性及び薬物相互作用評価を目的とし、臨床薬物動態試験法の確立及び妥当性の検証を行った。第 1 章では最も多くの医薬品代謝に関与する CYP3A4 の基質薬である midazolam を用いた 1 点採血又は尿検体による低侵襲な AUC 及び CL 評価法の検討を行った。第 2 章では CYP 誘導薬及び阻害薬併用によるカクテル薬投与時と CYP 基質薬 (CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4) 単独投与時との AUC 変動の程度を比較検討し、カクテル試験が CYP 基質薬単独投与時と同様に薬物相互作用を定量的に評価可能であるかどうか検討した。最後に第 3 章では、CYP 活性評価法の 1 つであるカクテル試験の低侵襲化を目的とし、カクテル試験での 1 点採血による CYP 活性評価法の検討を行った。

第1章 健常人におけるmidazolamの1ポイント血漿中濃度及び尿中排泄量を用いたAUC及びクリアランス予測

第1節 序論

CYP3A4 活性は性別や年齢、病態及び併用薬などの要因により個体間及び個体内で大きく変動する。現在までに CYP3A4 の活性は性別や年齢で大きく変化し、さらに病態などにより個体内でも変動することが知られている。例えば、肝臓での発現量には 10–100 倍、小腸では 30 倍の違いがあることや *in vivo* 試験による活性評価で 5–20 倍の個体差がある^{56,57)}。過去に CYP3A4 の基質薬である midazolam の全身クリアランスは男性に比べ、女性の方が 20–40% 高いという結果や肝硬変患者では CYP3A4 活性が 30–50% 減少したという結果も報告された^{58,59)}。また CYP3A4 を介する薬物相互作用は、臨床的に問題となることがある¹⁶⁻¹⁹⁾。過去に astemizole、terfenadine、cisapride、pimozide を服用中の患者が ketoconazole や erythromycin などの CYP3A4 阻害作用を有する薬物を同時に服用することで QT 延長が生じたと報告された¹⁶⁾。具体的には、pimozide 服用中の患者が clarithromycin を併用することで、pimozide の最高血漿中濃度及び AUC が上昇し、経口クリアランスは 46% 有意に低下した。また QT 延長が起こるリスクはプラセボ群と比較し、clarithromycin 服用群で有意に上昇した¹⁹⁾。

このように CYP3A4 活性変動は薬物の体内動態を変化させ、薬物治療効果や有害作用発現に影響を与えるため、CYP 活性を評価することは適切な薬物治療を行う上で重要であると考えられる。

これまでに CYP3A4 活性を評価するために様々な研究が行われており、活性評価のための基質として alprazolam、cortisol、erythromycin、lidocaine、midazolam、nifedipine、triazolam、verapamil などが用いられてきた^{60,61)}。ガイドラインにおいても CYP3A 基質として、midazolam、triazolam を基質とすることを推奨している²⁶⁻²⁸⁾。Midazolam の体内動態は 2 コンパートメントモデルであり、線形の薬物動態を示すことが知られている⁶²⁾。さらに midazolam は静脈内及び経口投与が可能であり、CYP3A4 による代謝と UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) によるグルクロン酸抱合をうける。また CYP3A4 により特異的に代謝され、1'-hydroxymidazolam 及び 4-hydroxymidazolam に変換されることや P 糖タンパクの基質でないことから、臨床試験において CYP3A4 活性評価のプロードラッグとして使用されている⁶³⁻⁶⁶⁾ (Fig. 1)。しかしながら、midazolam を用いて臨床試験を行う場合、AUC や CL などの薬物動態を解析するために頻回採血が必要であり、被験者や患者に大きな負担を与える。特に高齢者や小児患者、腎障害または肝障害患者においては低侵襲な採血方法が推奨される。そこで、この負担を軽減するために midazolam 投与後の採血回数を減らした方法 (limited-point sampling 法) による活性評価が試みられてきた。これまでに midazolam 投与後 3 回の採血により midazolam の AUC 予測を行った研究や単回採血による AUC 予測を行った研究はあるものの最適な採血時間に違いがあるなど、単回採血による CYP3A4 活性評価法は未だに確立されていない⁵⁰⁻⁵³⁾。また midazolam を用いた CYP3A4 活性評価法として尿検体による評価はわずかしが行われていない^{50,51,54)}。尿検体による CYP 活性評価が可能であれば、採血による侵襲の必要がなく、被験

者から midazolam 投与後の尿検体を集めるだけで CYP 活性評価を行うことができる。この手法は検体採取による侵襲がないため、小児や高齢者など様々な被験者へ応用可能であると考えられる。

そこで、第 1 章では midazolam とその代謝物の血漿中濃度ないし尿中排泄量と midazolam の AUC 及び CL との関係について明らかにし、1 点採血や尿検体による AUC 又は CL の予測が可能であるかどうか検討を行った。

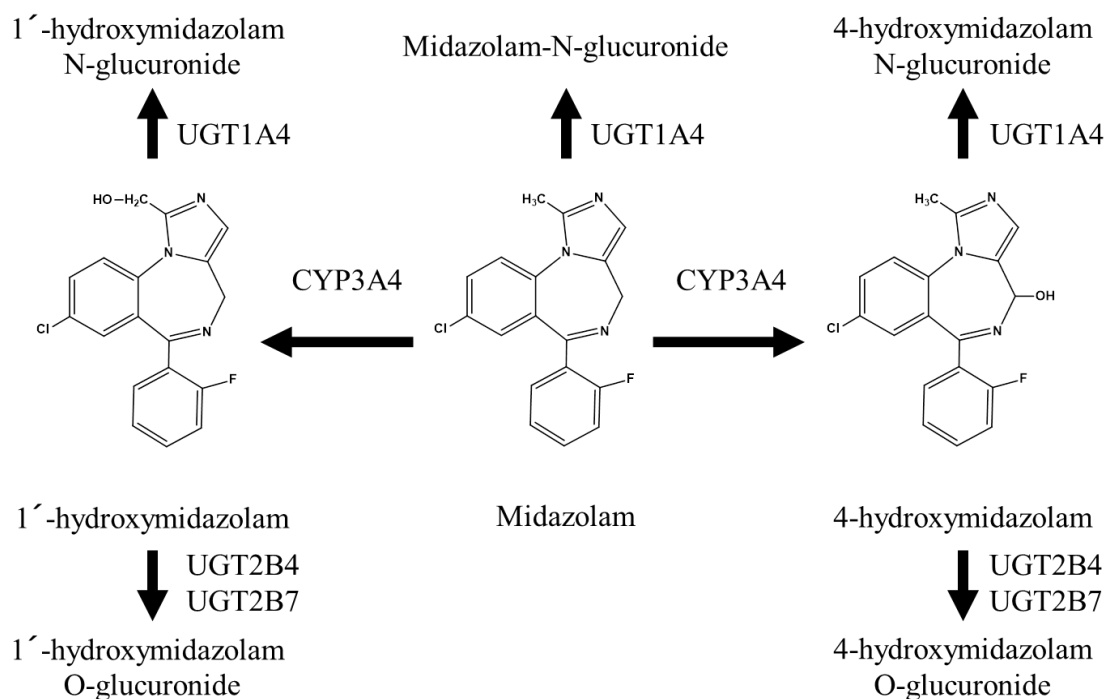


Fig. 1 Metabolic pathway of midazolam.

第2節 方法

1-2-1 試験方法

既に Misaka ら及び Yan らによって報告されている2つの臨床試験の結果をもとに解析を行った^{67,68}。健康成人 19 名を対象とし、合計 29 回の投与を含む2つの臨床試験結果の解析を実施した。

それぞれの試験では男性健康成人 5 名ないし健康成人 14 名（男性 8 名、女性 6 名）を対象とした。両試験とも連続した2日間で試験を実施した。1日目に midazolam 静脈内投与を行い、投与前、投与後 0.08、0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8、10 及び 24 時間に採血を行った。2日目には midazolam を経口投与し、投与前、投与後 0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10 及び 24 時間に採血を行った。さらに試験両日にわたり midazolam 投与後 24 時間まで畜尿を行った (Fig. 2)。血漿中 midazolam 及び代謝物濃度ならびに尿中 midazolam 及び代謝物排泄量は LC-MS/MS 法を用いて測定した。なお Misaka らの試験では midazolam 投与量を3期に分けて実施した⁶⁷。1期目として1日目に midazolam 5 µg/kg を静脈内投与、2日目に 15 µg/kg を経口投与した。最低1週間の休薬期間をおき、2期目では静脈内投与量を 15 µg/kg、経口投与量を 50 µg/kg、さらに3期目として静脈内投与量を 30 µg/kg、経口投与量を 100 µg/kg として midazolam 投与を行った。また Yan らの試験は2群2期のプラセボを対象としたオープンラベル化クロスオーバー法により実施した⁶⁸。2週間の休薬期間をはさみ、ursodeoxycholic acid (300 mg/day) またはプラセボを連続9日間服用した。服用8日目に midazolam 静脈内投与 (5 µg/kg)、9日目に経口投与 (15 µg/kg) を実施した。なお今回の解析にはプラセボ群のデータのみ使用し、ursodeoxycholic acid 併用群のデータは使用しなかった。

血漿中濃度を用いた解析では midazolam 投与後 10 時間までの血漿中濃度を用いており、静脈内投与では全 285 ポイント、経口投与では全 250 ポイントのデータをもとに解析を行った。また尿中濃度は 29 回分の投与データを用いて解析を実施した。なお両試験における被験者の臨床検査値に異常は認められなかった。

1-2-2 解析

1-2-2-1 薬物動態学的パラメータ解析

Midazolam 及びその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行った。AUC_{0-t} は以下の式で算出した:

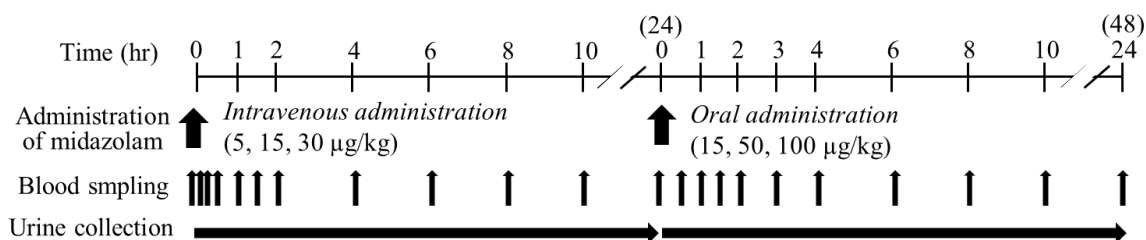


Fig. 2 Study design for administration of midazolam, blood sampling and collection of urine after intravenous or oral administration.

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

C : 血漿中濃度

t : 最終測定時間

AUC は最終測定時間 (t) までは台形法により算出した。

Midazolam 静脈投与後の全身クリアランス (CL_{total}) は、次式により算出した :

$$CL_{total} = \frac{Dose_{i.v.}}{AUC_{i.v.}}$$

Midazolam 経口投与後の経口クリアランス (CL/F) は、次式により算出した :

$$CL/F = \frac{Dose_{p.o.}}{AUC_{p.o.}}$$

血漿中代謝比は各採血ポイントにおける血漿中 midazolam 濃度及びその代謝物濃度をもとに以下の式で算出した :

$$\text{Metabolic ratio in plasma} = \frac{\text{Plasma concentration of 1'-hydroxymidazolam}}{\text{Plasma concentration of midazolam}}$$

尿中代謝比は尿中 midazolam 排泄量及び尿中代謝物排泄量から以下の式で算出した :

$$\text{Metabolic ratio in urine} = \frac{\text{Amount of urinary excretion of 1'-hydroxymidazolam and 4-hydroxymidazolam}}{\text{Amount of urinary excretion of midazolam}}$$

なお血漿検体では、4-hydroxymidazolam濃度は低値であったため除外した。

1-2-2-2 クロスバリデーション法による予測性解析

AUC又はCL予測の妥当性を評価するために、クロスバリデーション法を行った。まず29回の投与データから、解析に使用するための1回分の投与データ(テストセット)を除外した後、残りの28回の投与データ(トレーニングセット)を用いて直線回帰を行い、予測曲線式を算出した。予測曲線式に基づいて、AUC及びCLの予測値(AUC_{pred}、CL_{pred})を除外した1回分のテストセットを使用して算出した。全ての投与データを上記方法で解析し、AUC_{pred}又はCL_{pred}を算出した。

予測曲線式をもとに算出した AUC_{pred}、CL_{pred} と実測値 (AUC_{obse}、CL_{obse}) を用いて以下の式から平均予測誤差 (mean predict error, MPE)、平均絶対誤差 (mean absolute error, MAE)、平均二乗誤差平方根 (root mean squared error, RMSE) を算出した⁶⁹⁾。なお predicted value には AUC_{pred} 又は CL_{pred} を代入し、observed value には AUC_{obse} 又は CL_{obse} を代入し算出した。

$$\text{MPE} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\text{predicted value} - \text{observed value})$$

$$\text{MAE} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\text{predicted value} - \text{observed value}|$$

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n (|\text{predicted value} - \text{observed value}|)^2 \right)}$$

1-2-2-3 統計解析

統計解析は GraphPad Prism software (version 5.0; GraphPad, San Diego, CA, USA) を用いて行った。AUC と各採血ポイントにおける血漿中 midazolam 濃度及び尿中 midazolam 排泄量の間で、最小二乗法を用いて直線回帰を行った。CL_{total} 又は CL/F と血漿中及び尿中代謝比についても同様の解析を行った。相関性の有意性検定はピアソンの相関係数検定法に従った。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 結果

1-3-1 静脈内投与後の midazolam 血漿中濃度と AUC ならびに血漿中濃度代謝比と全身クリアランスの関係

Midazolam 静脈内投与後0.08–10時間のmidazolam血漿濃度とAUCの関係を検討した。血漿中midazolam濃度は全ての採血ポイントでAUCとの間に有意な正の相関が認められた (Fig. 3、Table 3)。決定係数は、静脈内投与後2時間で最も高値となった ($r^2 = 0.966$)。さらに、静脈内投与後1時間から2時間のMPE、MAE及びRMSE値は、それぞれ4–5%、12–16%及び15–21%の範囲であった (Table 3)。

血漿中濃度代謝比とmidazolamの CL_{total} の関係について検討した結果、midazolam投与後2時間から8時間の採血ポイントにおいて、両者の間に有意な正の相関が認められた (Fig. 4、Table 3)。Midazolam静脈内投与後の各採血ポイントにおける血漿中濃度代謝比と CL_{total} の決定係数は、midazolam投与後6時間で最高値となった ($r^2 = 0.473$)。MPE、MAE及びRMSEの値は、静脈内投与後4–8時間において、それぞれ3–5%、18–20%及び24–27%の範囲であった (Table 3)。

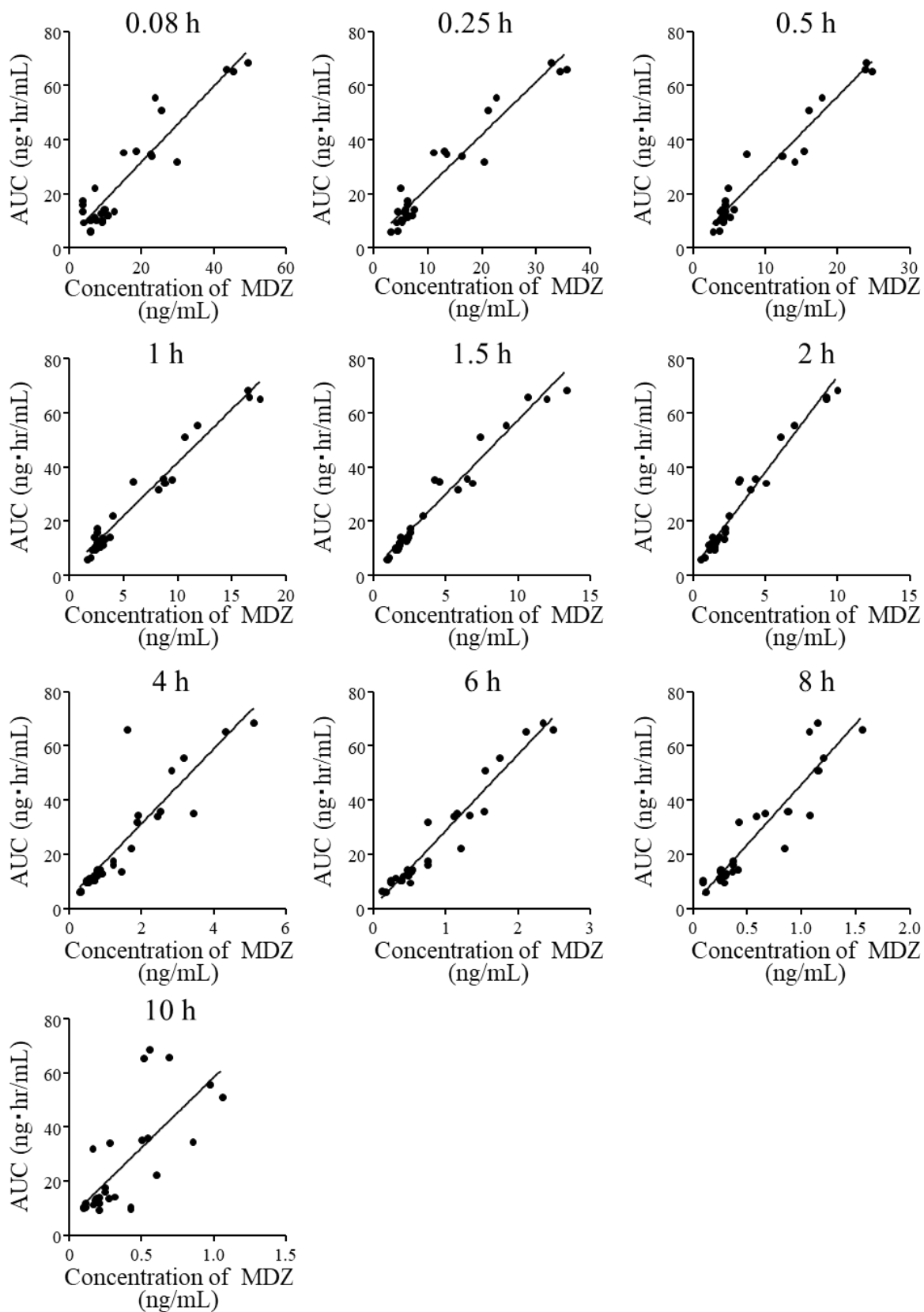


Fig. 3 The relationship between the plasma concentrations of midazolam at 0.08–10 h and the area under the curve (AUC) after the intravenous administration of midazolam. Each point represents the value of each volunteer. MDZ: midazolam.

Table 3 Coefficients of determination (r^2) and predictions of area under the curve (AUC) and total clearance (CL_{total}) after intravenous administration from plasma concentration of midazolam and metabolic ratio in plasma, respectively, at each sampling point.

Time (hr)	Correlation		Prediction		
	r^2	p	MPE (%)	MAE (%)	RMSE (%)
Plasma concentration vs. AUC					
0.08	0.867	< 0.001	10.36	35.74	44.00
0.25	0.930	< 0.001	9.09	22.71	28.08
0.5	0.948	< 0.001	6.51	19.31	25.38
1	0.964	< 0.001	5.27	16.20	20.67
1.5	0.964	< 0.001	4.41	12.20	14.50
2	0.966	< 0.001	4.81	13.81	16.48
4	0.786	< 0.001	18.93	25.62	18.93
6	0.943	< 0.001	18.23	24.19	18.23
8	0.862	< 0.001	23.69	30.08	23.69
10	0.522	< 0.001	43.48	63.56	43.48
Metabolic ratio in plasma vs. CL_{total}					
0.08	0.075	0.158	7.14	19.48	27.34
0.25	0.084	0.126	6.55	18.52	26.35
0.5	0.009	0.640	7.72	20.98	30.88
1	0.060	0.201	7.07	18.94	28.05
1.5	0.044	0.277	7.25	19.59	28.57
2	0.146	0.041	6.41	19.17	26.65
4	0.318	0.001	4.63	19.05	23.58
6	0.473	< 0.001	3.80	19.56	24.42
8	0.389	0.001	2.66	17.91	26.52
10	0.020	0.488	4.63	16.82	25.58

The p value was calculated using Pearson correlation coefficients.

MPE: mean prediction error, MAE: mean absolute error, RMSE: root mean squared error.

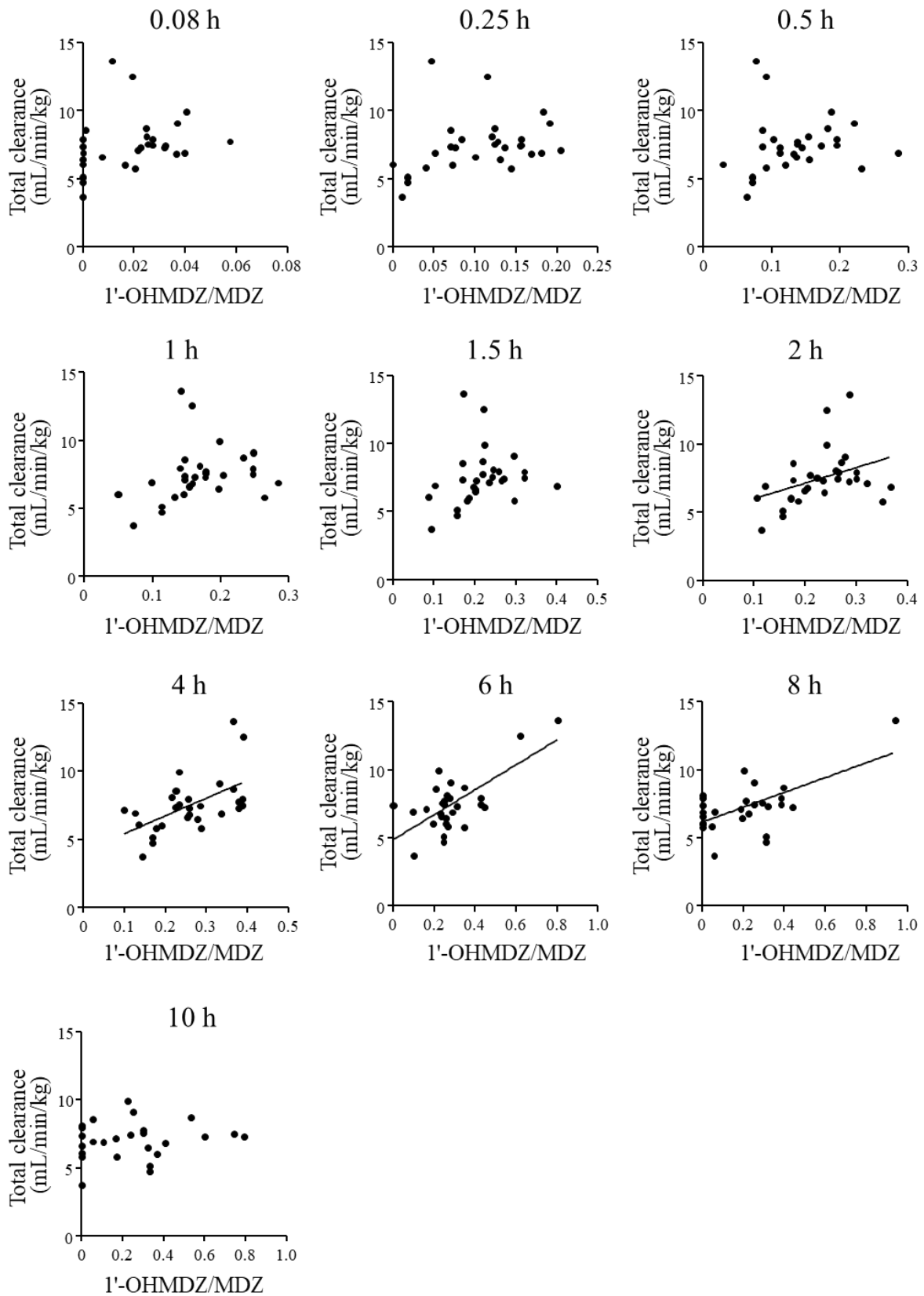


Fig. 4 The relationship between the metabolic ratio in plasma at 0.08–10 h and the total clearance of midazolam after the intravenous administration of midazolam. Each point represents the value of each volunteer. MDZ: midazolam, 1'-OHMDZ: 1'-hydroxymidazolam.

1-3-2 経口投与後のmidazolam血漿中濃度とAUCならびに血漿中濃度代謝比と経口クリアランスの関係

Midazolam経口投与の場合においても、血漿中midazolam濃度とmidazolamのAUCの間に全ての採血ポイントにおいて有意な相関が認められた (Fig. 5)。さらに投与後2-4時間における両者の決定係数は0.94より高値であり、midazolam経口投与後2時間における決定係数が最も高かった ($r^2 = 0.956$)。またRMSEは、midazolam経口投与後2-4時間において35-38%の範囲であった (Table 4)。

血漿中濃度代謝比とCL/Fの関係を解析した結果、midazolam投与後2時間から6時間において両者の間に有意な正の相関関係が認められた (Fig. 6)。Midazolam経口投与後、各採血ポイントでの血漿中濃度代謝比とCL/Fの決定係数は、投与後6時間で最も高値となった ($r^2 = 0.527$)。MPE、MAE及びRMSEは、midazolam経口投与後3-6時間でそれぞれ7-10%、28-29%、34-36%の範囲であった (Table 4)。

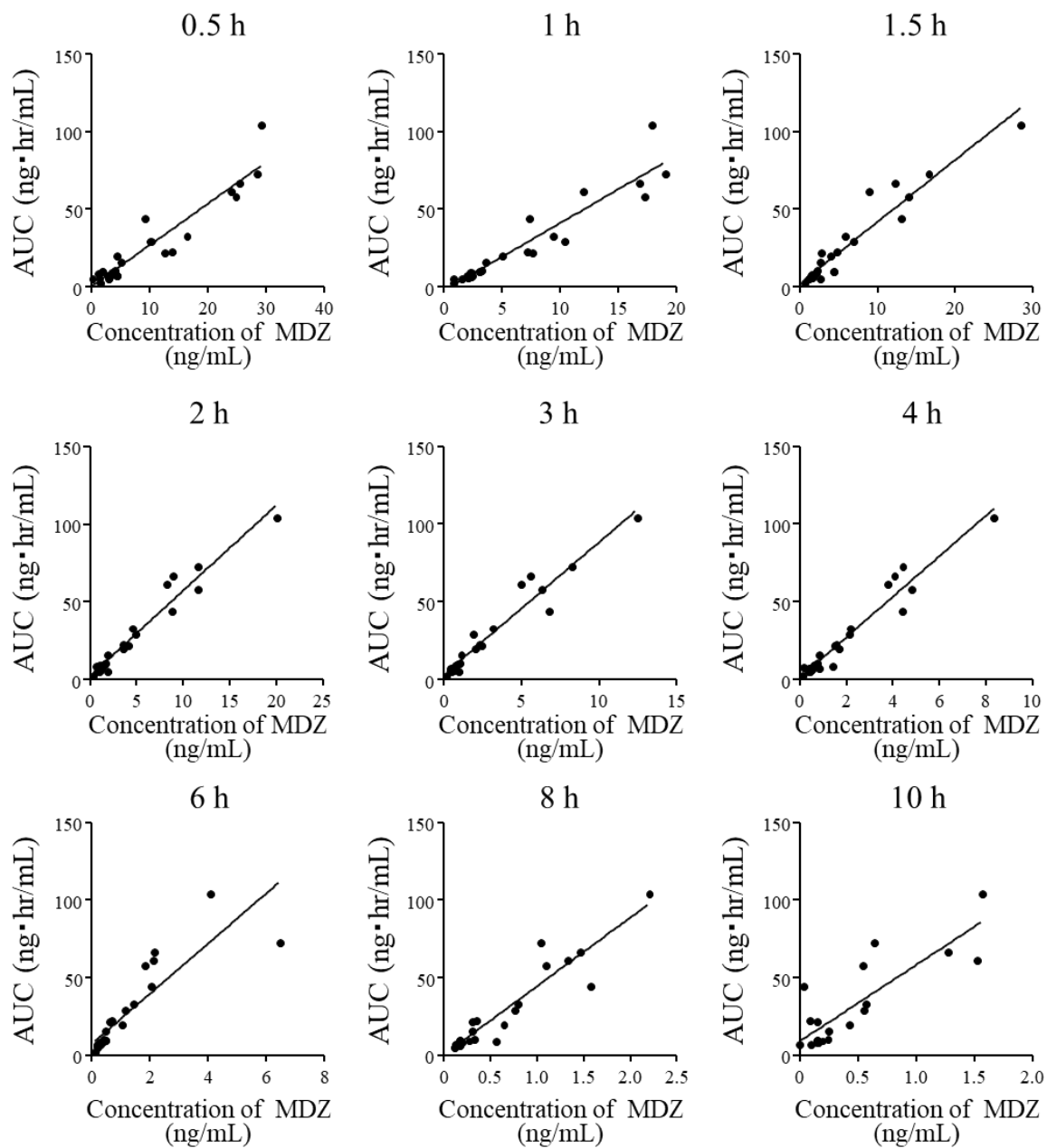


Fig. 5 The relationship between the plasma concentrations of midazolam at 0.5–10 h and the area under the curve (AUC) after the oral administration of midazolam. Each point represents the value of each volunteer. MDZ: midazolam.

Table 4 Coefficients of determination (r^2) and predictions of area under the curve (AUC) and oral clearance (CL/F) after oral administration from plasma concentration of midazolam and metabolic ratio in plasma, respectively, at each sampling point.

Time (hr)	Correlation		Prediction		
	r^2	p	MPE (%)	MAE (%)	RMSE (%)
Plasma concentration vs. AUC					
0.5	0.901	< 0.001	5.73	35.17	43.57
1	0.902	< 0.001	-0.52	21.56	27.23
1.5	0.920	< 0.001	20.42	32.94	48.38
2	0.956	< 0.001	12.14	23.28	38.31
3	0.945	< 0.001	13.83	22.50	35.90
4	0.948	< 0.001	7.79	21.99	34.70
6	0.760	< 0.001	40.52	56.78	77.26
8	0.887	< 0.001	8.34	25.05	43.36
10	0.712	< 0.001	34.83	58.96	67.35
Metabolic ratio in plasma vs. CL/F					
0.5	0.020	0.460	17.55	36.26	48.88
1	0.032	0.357	16.95	36.03	47.60
1.5	0.067	0.174	16.00	34.92	44.21
2	0.235	0.008	11.79	30.81	36.37
3	0.278	0.003	10.37	27.87	33.72
4	0.465	< 0.001	8.07	29.29	36.44
6	0.527	< 0.001	7.00	29.12	34.54
8	0.079	0.156	9.40	27.55	39.59
10	0.063	0.286	5.17	24.65	37.01

The p value was calculated using Pearson correlation coefficients.

MPE: mean prediction error, MAE: mean absolute error, RMSE: root mean squared error.

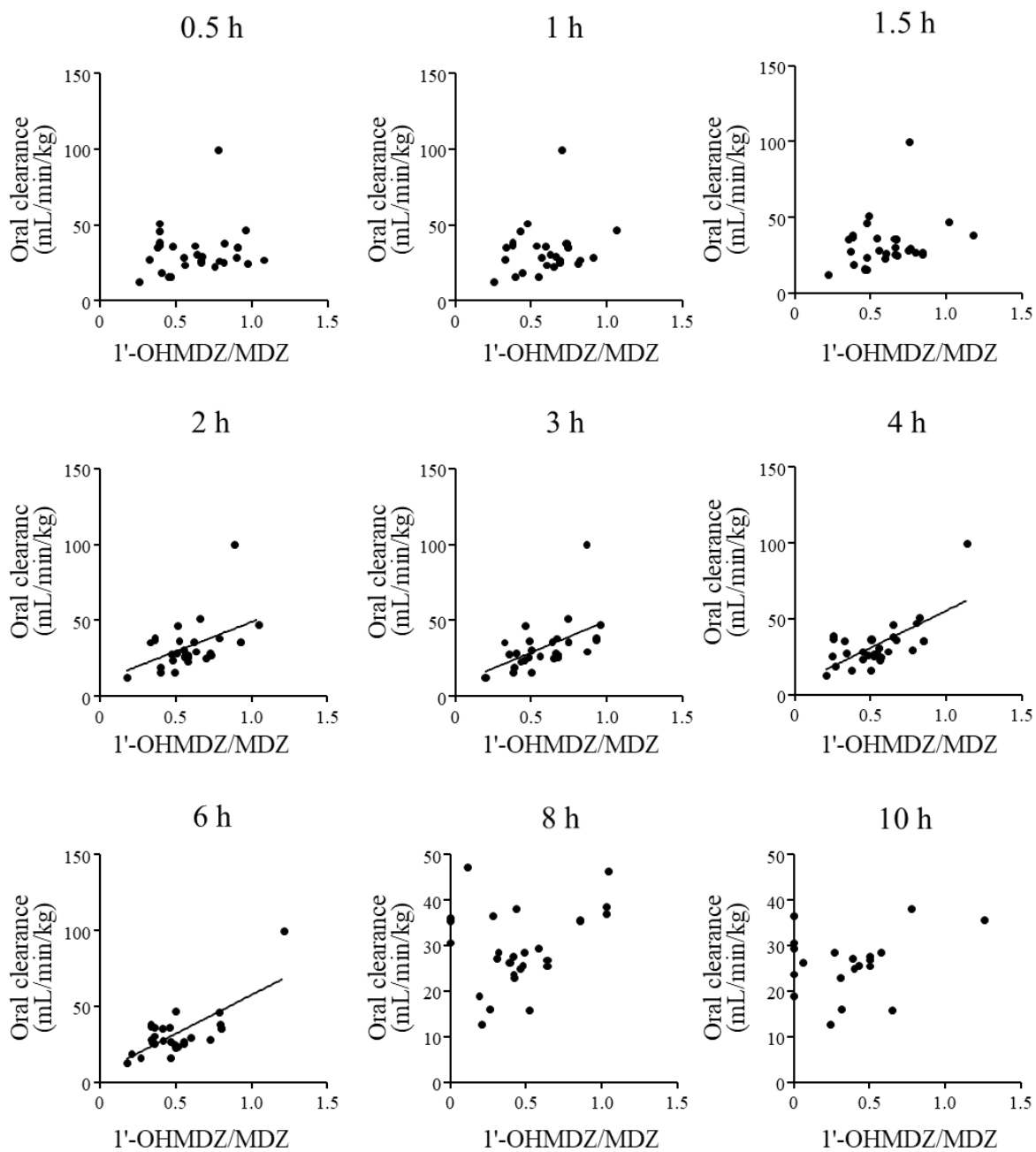


Fig. 6 The relationship between the metabolic ratio in plasma at 0.5–10 h and the oral clearance of midazolam after the oral administration of midazolam. Each point represents the value of each volunteer. MDZ: midazolam, 1'-OHMDZ: 1'-hydroxymidazolam.

1-3-3 尿中midazolam排泄量とAUCならびに尿中代謝比とクリアランスの関係

尿検体を用いた結果について検討したところ、静脈内投与では尿中midazolam排泄量はAUCと有意な相関を示さず、経口投与においてのみ両者の間に有意な相関が認められた ($r^2 = 0.727$) (Table 5)。

さらに尿中の代謝物とmidazolamの比である尿中代謝比とCLとの関係を調べたところ、いずれの投与においても両者の間に有意な相関は認められなかった。またMPE、MAE及びRMSEは、静脈内投与と経口投与において、それぞれ7-31%及び18-51%と低値を示した (Table 5)。

Table 5 Coefficients of determination (r^2) and predictions of area under the curve (AUC) and total clearance for intravenous administration or oral clearance for oral administration (CL) from urinary excretion of midazolam and metabolic ratio [(1'-hydroxymidazolam + 4-hydroxymidazolam) /midazolam] in urine, respectively, after intravenous and oral administration of midazolam.

	Correlation		Prediction		
	r^2	p	MPE (%)	MAE (%)	RMSE (%)
Intravenous administration					
Urinary excretion of midazolam and AUC of midazolam	0.101	0.093	65.51	95.19	138.70
Metabolic ratio in urine and CL of midazolam	0.027	0.391	6.61	21.24	30.62
Oral administration					
Urinary excretion of midazolam and AUC of midazolam	0.727	< 0.001	59.57	80.47	137.37
Metabolic ratio in urine and CL of midazolam	< 0.001	0.925	17.60	35.91	50.95

The p value was calculated using Pearson correlation coefficients.

MPE: mean prediction error, MAE: mean absolute error, RMSE: root mean squared error.

第4節 考察

本論は midazolam の血漿中濃度ないし尿中排泄量と midazolam の AUC との関係について明らかにし、さらに代謝物濃度も用いて midazolam の CL を予測する指標についても検討することで、侵襲性の低い midazolam の AUC 又は CL 評価法の確立を目指した。

通常 midazolam の薬物動態を解析するためには頻回採血を必要とし、被験者への負担が大きい。そこで被験者の負担を軽減するために limited-point sampling 法による活性評価が試みられてきた^{50-53,70)}。静脈内及び経口投与後、全ての採血ポイントで血漿中 midazolam 濃度は AUC と良好な相関を示した。また両者の決定係数は、全ての採血ポイントにおいて静脈内投与及び経口投与後、それぞれ1-2時間及び2-4時間で高値を示し、それぞれ $r^2 > 0.96$ 及び $r^2 > 0.94$ であった。静脈内投与においては投与後早期に決定係数が高値となった。また経口投与においても midazolam の最高血中濃度到達時間は0.5時間と早いことが報告されており、吸収過程によるばらつきが安定した時間以降の血漿中 midazolam 濃度と AUC の決定係数が高値となると考えられた⁶⁷⁾。また予測のバラツキや予測の精度を表す MPE、MAE 及び RMSE も、静脈内投与と経口投与後それぞれ1.5時間と4時間で最も低値となった。したがって、midazolam の AUC は、静脈内投与の1.5時間後及び経口投与の4時間後の血漿中 midazolam 濃度により評価できることが示唆された。

加えて、midazolam 静脈内投与後2時間から8時間における血漿中濃度代謝比は CL_{total} と有意な正の相関を示した。静脈内投与後6時間での決定係数は $r^2 > 0.4$ であった。経口投与においては midazolam 経口投与後4-6時間の血漿中濃度代謝比と CL/F の決定係数は高値を示した ($r^2 > 0.4$)。Midazolam の代謝物である血漿中 1'-hydroxymidazolam 濃度は低値であったが、血漿中代謝物濃度測定 of 定量限界は 0.1 ng/mL であり、両投与において十分に測定が実施でき、血漿中濃度代謝比の算出を行うことができた。Midazolam 静脈内及び経口投与後の midazolam 半減期は2-3時間であり、代謝物である 1'-hydroxymidazolam の半減期は2時間程度であると報告されており、両投与において半減期に大きな違いはなかった⁶⁷⁾。静脈内及び経口投与後2時間から6時間における血漿中濃度代謝比と CL の決定係数は時間の経過とともに徐々に増大し、投与後8時間以降で低下した。血漿中濃度代謝比による評価を行うためには midazolam が代謝され、十分に代謝物が生成されてから評価を行う必要があり、また CL を評価するための midazolam と 1'-hydroxymidazolam の濃度バランスが最適となる時間が存在すると考えられた。今回、各採血ポイントでの血漿中濃度代謝比と CL の間の決定係数は、静脈内投与と経口投与どちらにおいても投与後6時間で最も高値となった。これらの結果から、投与後6時間の血漿中濃度代謝比は midazolam の CL の指標となり得ると考えられた。しかしながら、これらの決定係数は血漿中濃度と AUC の関係よりも低値であった。

Chaobalらは、midazolam 静脈内及び経口投与後5時間と6時間の血漿中 midazolam 濃度が AUC 予測に最適であると報告している⁵¹⁾。一方、Linらは、投与後4時間での血漿中 midazolam 濃度が AUC 予測に最適であると報告した⁵²⁾。本結果では経口投与後の最適なサンプリング時間は同様であったが、静脈内投与後の最適なサンプリング時間はこれまでの報告と比較し、比較的早期であった。しかし、今回全ての採血ポイントで有意な相関が認められており、今まで

の報告と大きな差異はないと考えられる。また血漿中濃度代謝比とCLの決定係数は、血漿中濃度とAUCの係数よりも低値であった。CYP活性評価には各基質薬の血漿中濃度や血漿中代謝比を用いてAUCやCLの評価が行われており、ガイドラインでも各基質薬のAUC又はCL評価が重要であることが述べられている。代謝比を用いた評価では、CYP基質薬の母化合物及びその代謝物の両化合物を評価することで吸収や排泄に関わる影響を除外し、代謝による影響を評価することが可能である。しかしながら基質により複数のCYP代謝物が存在する場合もあり、正確な評価のためには全ての代謝物評価が必要となり、代謝比を用いた評価は困難な場合もある。

本論ではクロスバリデーション法を用いて MPE、MAE 及び RMSE を算出し、予測バイアスと精度を評価した。Midazolam 静脈内投与 1.5 時間におけるバイアスと精度は 15%未満であり、以前の研究で報告された評価法の許容範囲内であった^{48,71)}。しかし、経口投与後 4 時間における予測バイアス (MPE) は制限範囲であったが、予測精度の指標である MAE、RMSE は、文献報告と比較すると比較的高い値を示した。Midazolam 経口投与における CYP3A4 の代謝は静脈内投与の場合と異なり、肝臓及び腸管の CYP3A4 の影響を受ける⁷²⁾。このため経口投与による CYP3A4 活性評価は肝臓及び腸管の CYP 活性を評価することとなる。静脈内投与後 1.5 時間における midazolam 濃度を用いた AUC 予測精度は経口投与後 4 時間における midazolam 濃度を用いた AUC 予測と比較して、良好であった。経口投与における midazolam 濃度を用いた AUC 評価では、吸収の影響のみならず、腸管の CYP3A4 の影響も含むため予測精度が静脈内投与の場合より低くなったと考えられる。またこれまでには、複数サンプリング (3 回又は 4 回の採血) による予測モデルは、1 点採血を使用した場合と比較して、midazolam の AUC 予測のバイアスと精度の誤差が小さいことが報告されている^{50,70,71,73)}。しかしながら、臨床試験において患者から複数回採血を行うことは困難な場合が多いため、1 点採血による評価は CYP3A4 の *in vivo* phenotyping を行う上で重要である。興味深いことに、Misaka らは midazolam の低用量投与は臨床効果や副作用の発現につながらないことを報告している⁶⁷⁾。したがって、低用量 midazolam 投与後の 1 点採血は、高齢者や小児患者、または腎障害、肝障害患者など薬物投与や採血回数に制限のある患者に対しても安全に行うことが可能だと考えられる。採血回数を減らすことで穿刺回数や採血量を減らすことができ、低用量の薬剤投与により薬効を発現させずに試験を行うことができる 1 点採血による評価法は有用な方法であることが示唆される。

これまでmidazolamを用いたCYP3A4活性評価に関する報告は血漿中濃度をもとに行われており、尿検体を用いた解析はほとんど行われていない。CYP活性評価法として尿検体を使用することができれば、採血を必要とせず、被験者の負担を軽減できる。今回、尿中midazolam排泄量がAUC又はCLを予測できるかどうかを明らかにするために、midazolamの尿中排泄又は尿中代謝比とmidazolamのAUC又はCLとの関係について検討を行った。尿中midazolam排泄量を用いた検討では、経口投与のみmidazolamのAUCとの間に有意な正の相関が認められた。このためmidazolam尿中排泄量が経口投与後のAUC予測の指標となり得る可能性がある。また静脈内投与では投与量が少ないため、尿中midazolam排泄量も低値となり、十分に評価できなかった可能性が考えられた。

Streetmanらは尿中代謝比はCYP3A4阻害の指標として有用であることを報告したが、本論では尿中代謝比はmidazolamのCLと相関関係が認められなかった。Streetmanらの報告では、薬物相互作用によりmidazolamのCLを変化させている⁵⁴⁾。しかし本論ではmidazolam投与量を変更することで血漿中濃度を変化させたが、CL変動はわずかであった。このため尿中代謝比とCLの間に相関関係が認められなかった可能性が考えられた。

以上の結果から、midazolamのAUCは静脈内投与後1.5時間及び経口投与後4時間の血漿中midazolam濃度を評価することで予測することが可能であると考えられた。さらに、midazolam経口投与後の尿中midazolam排泄量はAUC評価の指標となる可能性が認められた。これらの方法は、midazolamのAUC予測に使用でき、CYP3A4の*in vivo* phenotypingに適用できる可能性がある。またこの方法は侵襲性が低く、相互作用や代謝活性の個人差予測に対し応用可能であると考えられる。

第2章 定量的薬物相互作用評価のためのカクテル試験の検証

第1節 序論

カクテル試験を行うことで一度に複数のCYP活性や薬物相互作用を評価することが可能である³⁹⁻⁴⁶。"Pittsburgh cocktail"、"Karolinska cocktail"、"Cooperstown cocktail"、"Inje cocktail"などの様々なカクテル試験が行われている^{39-43,47,74}。Inje cocktailはCYP1A2の基質としてcaffeine、CYP2C9の基質としてlosartan、CYP2C19の基質としてomeprazole、CYP2D6の基質としてdextromethorphan、CYP3A4基質としてmidazolamが用いられており、全ての基質薬は経口投与可能である⁴²。さらに安全性も高い薬剤であることから、本論では同様の基質薬を用いてカクテル試験を実施した。

カクテル試験は一度の試験により複数の薬物相互作用を評価できることが期待されているが、多くのカクテル試験は各CYP基質薬同士の相互作用がないことを評価している^{39,40,47}。このためCYP誘導薬又は阻害薬併用時のカクテル薬を用いた各基質薬の薬物動態変化がCYP基質薬単独投与時における薬物動態変化と同等かは不明であり、カクテル試験で薬物相互作用の定量的評価が可能であるかは明らかでない。

第2章では、CYP誘導薬又は阻害薬併用時の薬物相互作用をカクテル試験及び基質薬単独投与試験の結果を比較することにより、薬物相互作用検出及び定量的評価方法としてのカクテル試験の妥当性を検証することを目的とした。

CYP阻害薬及び誘導薬として、すでに阻害作用又は誘導作用が知られている典型的な薬剤であるcimetidine、fluvoxamine、rifampicinを用いた。Cimetidineは消化性潰瘍治療薬であり、胃壁細胞に存在するH₂受容体を阻害して胃酸分泌を抑制する⁷⁵。Cimetidineは多種のCYP分子種を阻害するが、特にCYP2D6とCYP3A4を強力に阻害する⁷⁶。またCYP2C19阻害作用も知られている^{77,78}。このため併用薬の代謝を抑制し、血漿中濃度を著しく上昇させ、副作用などの出現の可能性を高めることが知られている⁷⁹。Fluvoxamineは選択的セロトニン再取り込み阻害作用を持つ抗うつ薬であり、CYP1A2とCYP2C19を強力に阻害する。よって、これらの基質となる薬物を併用するとその血漿中濃度を上昇させる⁸⁰。Rifampicinは結核治療薬であり、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⁸¹。Rifampicinには強力なCYP誘導作用があり、併用薬の代謝を促進し血漿中濃度を低下させ、臨床効果を低下させる^{82,83}。Rifampicinは多くのCYP誘導作用があるが、中でもCYP3A4誘導作用は広く知られている⁸⁴⁻⁸⁷。

カクテル試験の薬物相互作用の定量的な検出法としての妥当性を検証することを目的として、カクテル試験によるCYP活性評価と単一のCYP基質薬(CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4)を用いた単独投与試験によるCYP活性評価の結果を比較検討した。

第2節 方法

2-2-1 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、E-3174、5-hydroxyomeprazole 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)、リファジンカプセルは第一三共 (東京)、タガメット錠は大日本住友製薬株式会社 (大阪)、デプロメール錠は Meiji Seika ファルマ株式会社 (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。

2-2-2 カクテル試験

2-2-2-1 対象

被験者は健康成人男性 19 名を対象とし、年齢 22.9 ± 2.5 歳、体重 63.9 ± 7.8 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 1 週間前より caffeine を含有する飲料やグレープフルーツジュースなどの柑橘系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の研究倫理委員会において承認後、ヘルシンキ宣言を遵守して実施した。本試験は UMIN 臨床試験登録システムに登録して実施した (UMIN000016113)。

2-2-2-2 試験方法

2-2-2-2-1 カクテル薬投与

被験者は caffeine 100 mg (カフェイン「ホエイ」)、losartan 25 mg (ニューロタン錠)、omeprazole

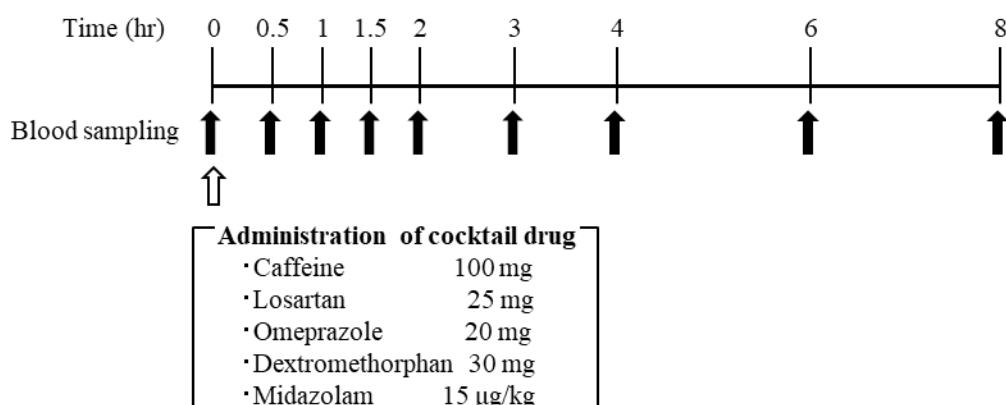


Fig. 7 Time schedule of administration of cocktail drug (caffeine, losartan, omeprazole, dextromethorphan and midazolam) and blood sampling. The black arrow shows the timing of blood sampling. The cocktail drug was administered at the start of the cocktail study.

20 mg (オメプラール錠)、dextromethorphan 30 mg (メジコン錠)、midazolam 15 µg/kg (ドルミカム注) 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 (Fig. 7)。1 回採血量は 7 mL とし、血液より血漿検体を分離し、-80°C で保存した。検体を用いて血漿中薬物濃度及び主代謝物濃度を測定した。被験者は一晩絶食し、カクテル薬投与の 4 時間後に標準食を摂取した。

2-2-2-2 全体スケジュール (CYP 誘導薬及び阻害薬投与方法)

Control 期、rifampicin 期、cimetidine 期、fluvoxamine 期の計 4 期に渡ってカクテル試験を行った。なお、各期の間には、CYP に対する各誘導及び阻害の wash out 期間として 2 週間以上の休薬期間を設けた。

被験者は rifampicin 期では、試験前日まで rifampicin 450 mg (リファジンカプセル) を 1 日 1 回、朝食前に 6 日間服用し、試験当日にカクテル薬を服用し、2-2-2-2-1 の方法でカクテル試験を行った。Cimetidine 期では、cimetidine 400 mg (タガメット錠) を試験前日の朝と就寝前、試験当日の朝に 1 回服用した後、control 期と同様の方法でカクテル試験を行った。Fluvoxamine 期も同様に、fluvoxamine 25 mg (デプロメール錠) を試験前日の朝と就寝前、試験当日の朝に 1 回服用した後、control 期と同様の方法でカクテル試験を行った (Fig. 8)。

2-2-3 基質薬単独投与試験

2-2-3-1 対象

被験者は健康成人男性 24 名を対象とし、年齢 23.4 ± 3.2 歳、体重 65.2 ± 8.1 kg であった。試験に関する同意取得や試験前の禁止事項は、2-2-2-1 と同様である。また本試験は UMIN 臨床試験登録システムに登録して実施した (UMIN000020286)。

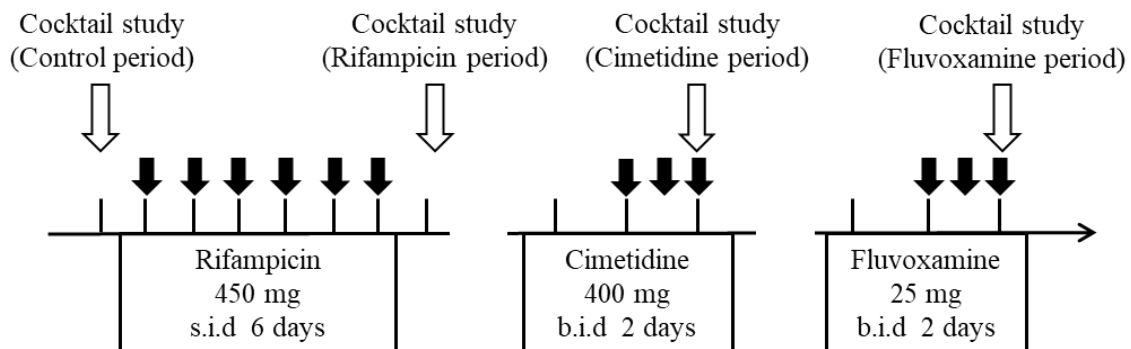


Fig. 8 Time schedule of cytochrome P450 (CYP) inducer (rifampicin) and inhibitor (cimetidine or fluvoxamine) administration in cocktail study. The black arrow shows the timing of administration of CYP inducer or inhibitor.

2-2-3-2 試験方法

2-2-3-2-1 基質薬単独投与

被験者は A、B、C、D グループの各グループに 6 人ずつ割り振られ、A グループは caffeine 100 mg (カフェイン「ホエイ」)、B グループは losartan 25 mg (ニューロタン錠)、C グループは omeprazole 20 mg (オメプラール錠)、D グループは dextromethorphan 30 mg (メジコン錠) を服用した。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 (Fig. 9)。採血量及び検体保管に関しては、2-2-2-2-1 と同様に実施した。

2-2-3-2-2 全体スケジュール (CYP 誘導薬及び阻害薬投与方法)

本試験は文献報告のない CYP 基質と CYP 誘導薬又は阻害薬の組み合わせに関して試験を実施した。A グループは control 期、rifampicin 期、fluvoxamine 期の計 3 期、B グループは control 期、fluvoxamine 期の計 2 期、C グループは control 期、rifampicin 期、cimetidine 期の計 3 期、D グループは control 期、rifampicin 期、cimetidine 期、fluvoxamine 期の計 4 期に渡って単独投与試験を行った。なお、各期の間には、CYP に対する各誘導及び阻害の wash out 期間として 2 週間以上の休薬期間を設けた。

Rifampicin 期、cimetidine 期、fluvoxamine 期は 2-2-2-2-2 と同様のスケジュールで試験を実施した (Fig. 10)。

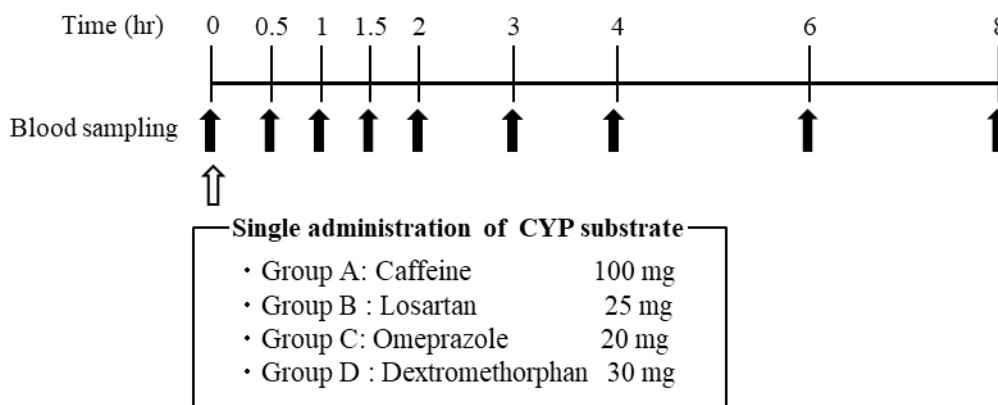


Fig. 9 Time schedule of administration of single cytochrome P450 (CYP) substrate (caffeine, losartan, omeprazole or dextromethorphan) and blood sampling. The black arrow shows the timing of blood sampling. The CYP substrate was administered at the start of the single administration study.

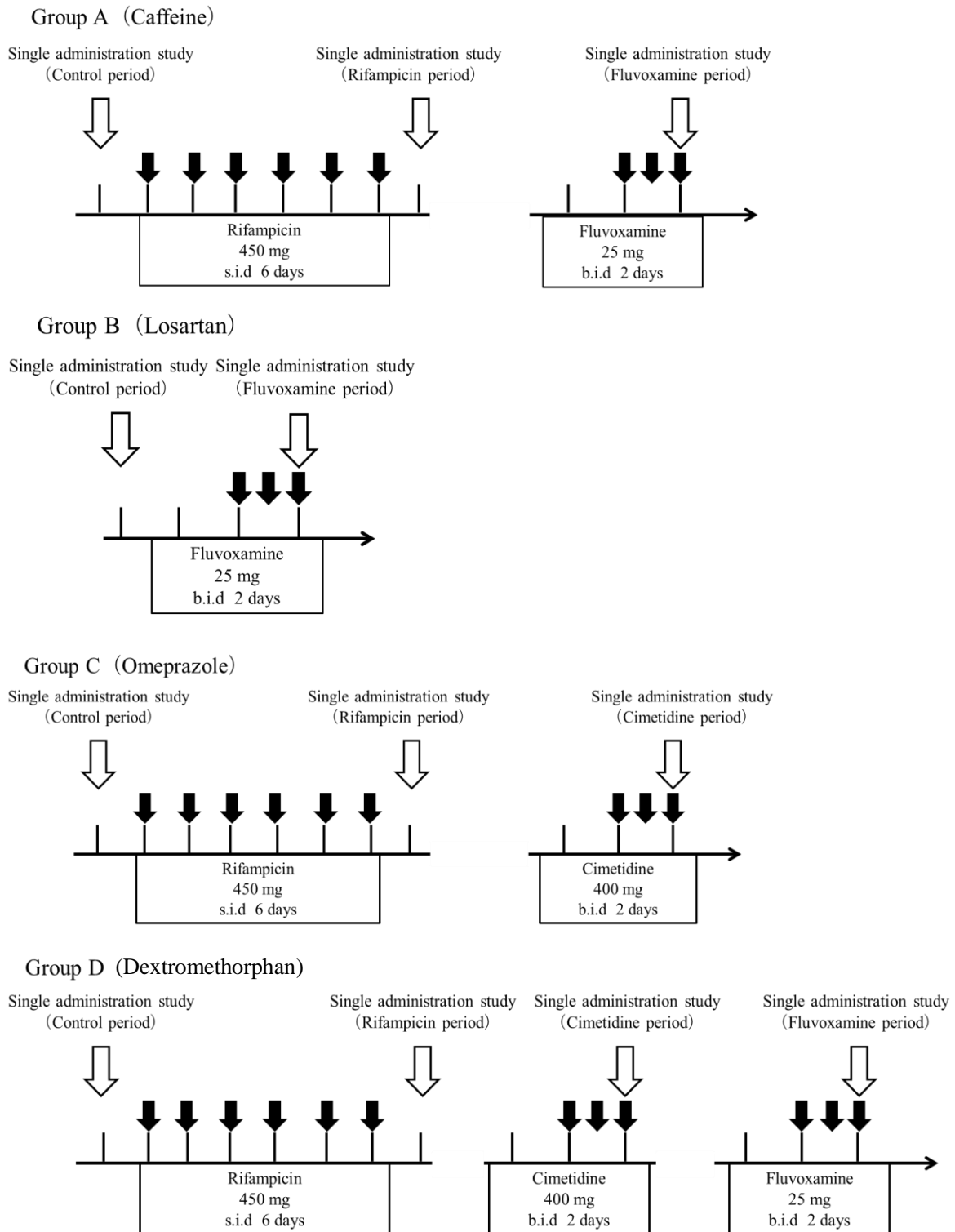


Fig. 10 Time schedule of cytochrome P450 (CYP) inducer (rifampicin) and inhibitor (cimetidine or fluvoxamine) administration in single administration study. The black arrow shows the timing of administration of CYP inducer or inhibitor. In group A were administered caffeine. In group B were administered losartan. In group C were administered omeprazole. In group D were administered dextromethorphan.

2-2-4 血漿中の薬物及び代謝物濃度測定

2-2-4-1 血漿検体の前処理方法

血漿検体 0.3 mL に内部標準物質として nitrazepam (100 ng/mL) を 100 μ L 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 10 μ L を LC-MS/MS 用試料とした。

2-2-4-2 LC-MS/MS 条件

HPLC は 1100LC 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 PAK C18 MGIII S-5 (10 mm \times 2 mm; id, 5 μ m、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、測定 0–6 分は A:B (77.5:22.5)、6–12 分は A:B (1:9) とした。流速は 0.2 mL/min、測定時間を 12 分とした。

質量分析器は API3000 system (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 6)。全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 7 で示した濃度を用いて作成し、 $1/x^2$ で重み付けを利用した⁸⁸⁾。

Table 6 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
E-3174	+	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.

Table 7 Calibration curves and sensitivity of the assay of human plasma and urine.

CYP probe drugs /metabolite	Retention time (min)	Plasma calibration range (ng/mL)
Caffeine	5.5	10–10000
Paraxanthine	4.4	10–10000
Losartan	10.6	1–1000
E-3174	10.3	1–1000
Omeprazole	10.8	1–1000
5-hydroxyomeprazole	10.4	1–1000
Dextromethorphan	11.2	0.1–100
Dextrorphan	9.5	0.1–100
Midazolam	11.7	0.1–100
1'-hydroxymidazolam	11.2	0.1–100

2-2-5 文献レビューによるレトロスペクティブ分析

2-2-5-1 文献検索

論文データベース PubMed を用いて、単一の CYP 基質薬 (CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4) ならびに CYP 誘導薬及び阻害薬を併用した際の薬物相互作用に関する論文の検索を行った。対象言語は英語とし、対象論文は 2019 年 3 月 31 日までに公表された論文とした。また検索に使用する key words は以下の通りとした。

Key words : caffeine、losartan、omeprazole、dextromethorphan、midazolam、rifampicin、cimetidine、fluvoxamine

検索式 : (caffeine OR losartan OR omeprazole OR dextromethorphan OR midazolam) AND (rifampicin OR cimetidine OR fluvoxamine)

2-2-5-2 文献の選択とデータの抽出

収集した論文の中から解析に必要な論文を選択するために、以下の条件を満たすものを解析対象として選択した。

- 1) ヒト (成人) を対象としている。
- 2) 被験薬を経口投与している。
- 3) CYP 基質薬を単独投与している。
- 4) 目的の薬物同士の相互作用を検出している。
- 5) CYP 誘導薬及び阻害薬併用時、非併用時の CYP 基質薬の AUC もしくは CL の記載がある。

収集した論文及び総説論文については、それぞれの論文における引用文献を参照し、新たな論文の検索を行った。またマイクロドーズ試験は除外した。

2-2-6 CYP2C19 の遺伝子多型評価

ゲノム DNA は、手順書に従って QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen、Hiden、Germany) を用いて末梢リンパ球から抽出した。CYP2C19 * 1、CYP2C19 * 2、CYP2C19 * 3 は、すでに報告されている TaqMan-based assay で同定した⁸⁹⁾。

2-2-7 薬物動態学的パラメータ解析

各薬物及び代謝物の薬物動態学的パラメータはノンコンパートメント解析法により算出した。AUC_{0-t} は 1-2-2-1 と同様の方法で算出した。

2-2-8 データ解析

データは平均値 ± 標準偏差で表示した。統計解析は GraphPad Prism software (version 5.0, GraphPad, San Diego, CA, USA) を用いて行った。基質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、Wilcoxon の符号順位検定より行った。Control 期を基準とし、

rifampicin 期、cimetidine 期及び fluvoxamine 期を比較したため、カクテル試験では rifampicin 期、cimetidine 期、fluvoxamine 期の計 3 回、単独投与試験における A グループは rifampicin 期、fluvoxamine 期の計 2 回、B グループは fluvoxamine 期の 1 回、C グループは rifampicin 期、cimetidine 期の計 2 回、D グループは rifampicin 期、cimetidine 期、fluvoxamine 期の計 3 回の検定を行った。したがって統計学的解析において、Bonferoni 補正によりカクテル試験では危険率 1.7%未満、単独投与試験における A グループは危険率 2.5%未満、B グループは危険率 5%未満、C グループは危険率 2.5%未満、D グループは危険率 1.7%未満を有意差ありと判定した。

文献検索により CYP 誘導薬及び阻害薬投与後、各 CYP 基質薬を単独投与し、CYP 活性を評価している論文を選択した。カクテル試験、基質薬単独投与試験、採用した論文の AUC 変動率を求めた。AUC 変動率は、以下の式で算出した：

$$\text{AUC 変動率} = \frac{\text{誘導薬又は阻害薬投与後の CYP 基質薬の AUC (ng} \cdot \text{hr/mL)}}{\text{Control の CYP 基質薬の AUC (ng} \cdot \text{hr/mL)}}$$

CYP 基質薬と誘導薬及び阻害薬の組み合わせにおいて、複数の論文が選択された場合、それぞれの AUC 変動率の平均値を用いた。

2-2-9 文献報告及び基質薬単独投与試験とカクテル試験の比較

採用した文献及び単独投与試験の AUC 変動率とカクテル試験の AUC 変動率を比較した。文献報告及び単独投与試験の AUC 変動率とカクテル試験の AUC 変動率の間で、最小二乗法を用いて直線回帰を行い、相関係数を算出した。相関性の有意性検定はピアソンの相関係数検定法に従った。危険率 5%未満を有意差ありと判定した。

さらに、文献報告及び基質薬単独投与試験とカクテル試験の AUC 変動率比を求め、両者の相対的な差異を確認した。AUC 変動率比は、以下の式で算出した：

$$\text{AUC 変動率比} = \frac{\text{カクテル試験の CYP 基質薬の AUC 変動率}}{\text{文献報告及び基質薬単独投与試験の CYP 基質薬の AUC 変動率}}$$

第3節 結果

2-3-1 カクテル試験による CYP 活性変動評価

Caffeine の AUC は control 群と比較して、cimetidine 群と fluvoxamine 群でそれぞれ 38%と 71%有意に増加した。Caffeine の AUC は rifampicin 群では有意な変化は認められなかった (Fig. 11 A)。Losartan の AUC は control 群と比較して、rifampicin 群で 42%減少した。しかしながら、cimetidine 群と fluvoxamine 群の AUC は control 群と比べ、ほとんど変化が認められなかった (Fig. 11 B)。Omeprazole の AUC は control 群と比較して、cimetidine 群及び fluvoxamine 群でそれぞれ 139%及び 184%増加した。Rifampicin 群では、omeprazole の AUC は 18%に減少した (Fig. 11 C)。Dextromethorphan の AUC は cimetidine 群で有意な増加を示し、control 群と比較して 147%増加した。Fluvoxamine 群では dextromethorphan の AUC に変化は認められなかったが、rifampicin 群では 34%の有意な減少が認められた。(Fig. 11 D)。Midazolam の AUC は control 群と比べ、cimetidine 群で 55%有意に増加した。一方、rifampicin 群は control 群と比較して 5%まで大幅に減少した (Fig. 11 E)。

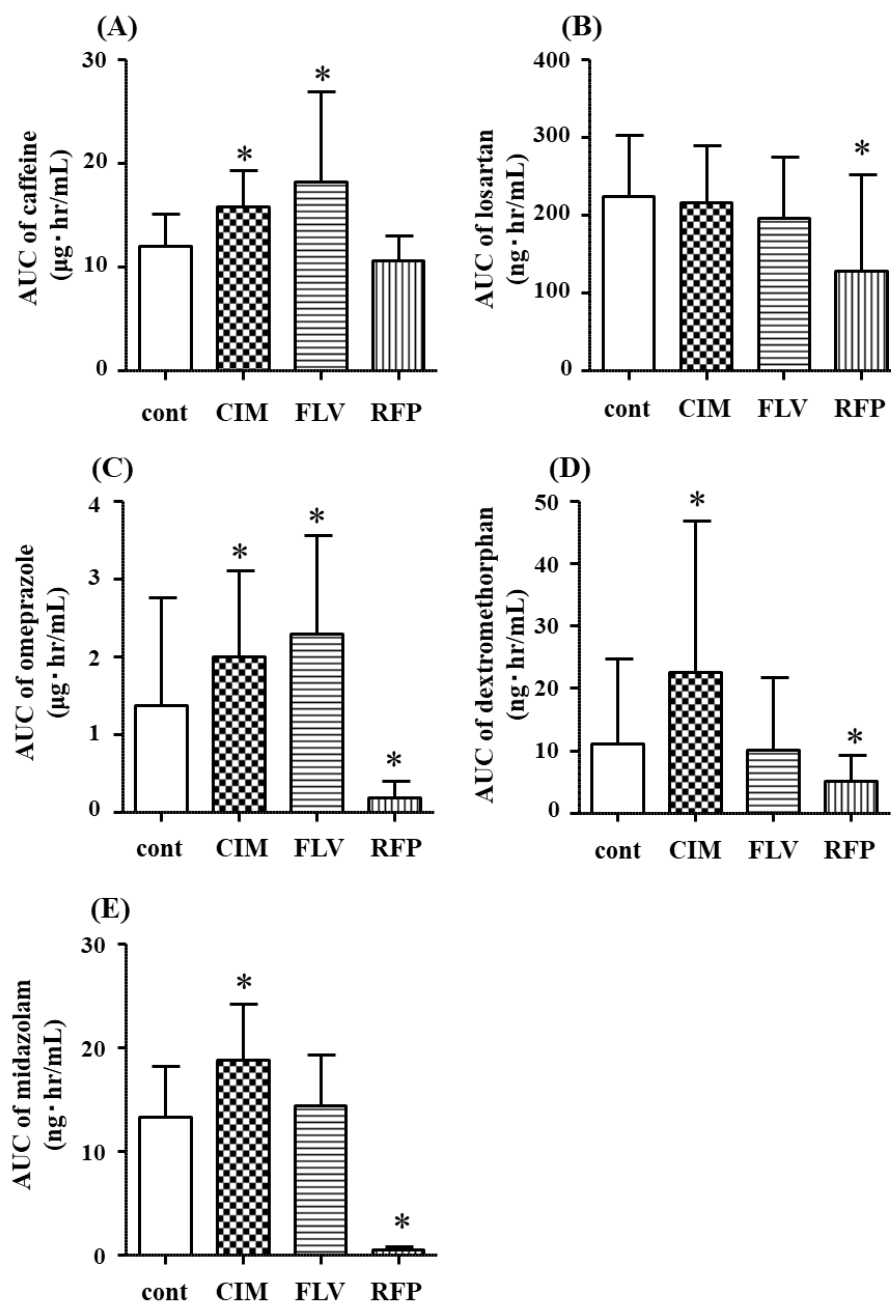


Fig. 11 AUC results for caffeine, losartan, omeprazole, dextromethorphan, or midazolam in combination with control, cimetidine, fluvoxamine or rifampicin in the cocktail study.

(A) AUC of caffeine, (B) AUC of losartan, (C) AUC of omeprazole, (D) AUC of dextromethorphan and (E) AUC of midazolam in combination with control, cimetidine, fluvoxamine or rifampicin.

Values are presented as the mean \pm SD. * $p < 0.017$ compared with the AUC of the control using the Wilcoxon signed-rank tests, and using a Bonferroni correction for multiple comparisons.

AUC: area under the curve, cont: control, CIM: cimetidine, FLV: fluvoxamine, RFP: rifampicin.

2-3-2 CYP 基質薬単独投与試験による CYP 活性変動評価

CYP 基質薬と CYP 誘導薬又は阻害薬の 15 組の組合せのうち文献で報告されていない 8 組について CYP 基質薬単独投与試験を実施した。その結果、caffeine の AUC は、fluvoxamine 前投与により control 群と比較して 76%増加した。Rifampicin 前投与では、caffeine の AUC は 6%減少したが、有意差は認められなかった (Fig. 12 A)。また fluvoxamine 前投与により losartan の AUC に有意な変化は認められなかった (Fig. 12 B)。Omeprazole の AUC は、control 群と比較して、cimetidine 前投与により 82%増加した。さらに、rifampicin 前投与による omeprazole の AUC は、control 群と比較して 88%の減少が認められたが、有意差は認められなかった (Fig. 12 C)。Dextromethorphan の AUC は、cimetidine 前投与により control 群と比較して 155%増加した。さらに、rifampicin 前投与における dextromethorphan の AUC は、control 群と比較して 77%の減少を示した (Fig. 12 D)。

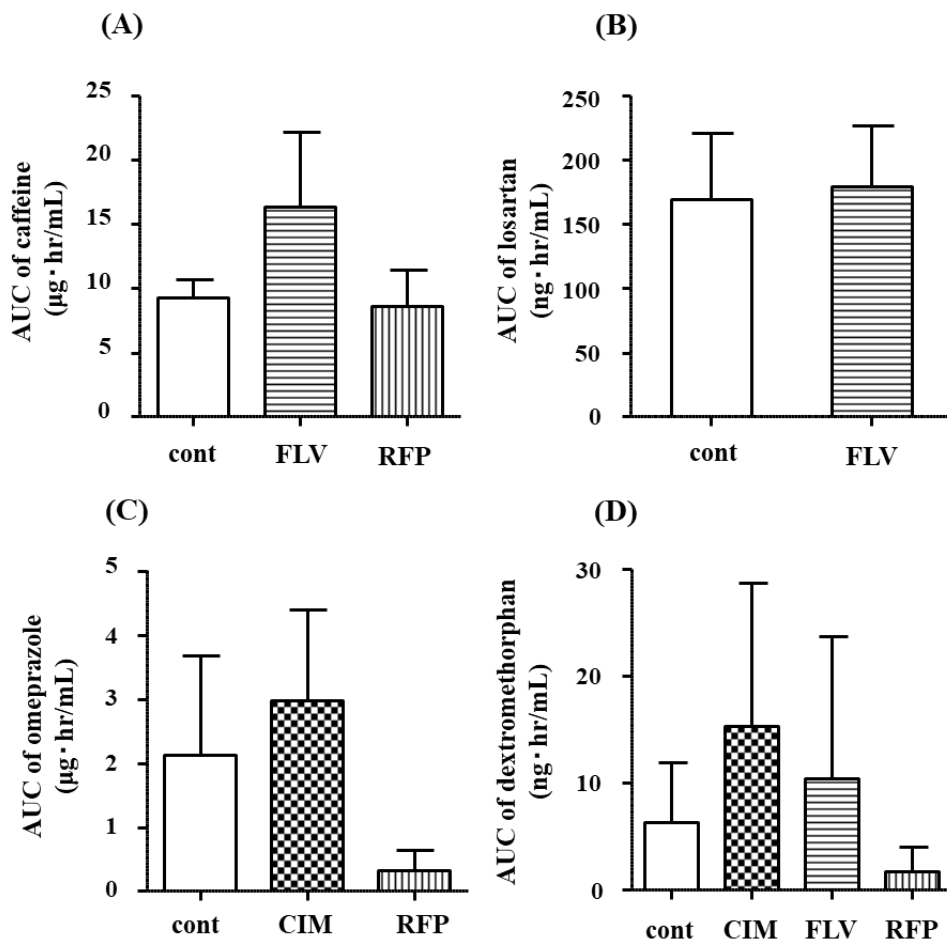


Fig. 12 Results of AUC for caffeine, losartan, omeprazole or dextromethorphan in combination with control, cimetidine, fluvoxamine or rifampicin in single administration studies.

(A) AUC of caffeine in combination with control, fluvoxamine or rifampicin, (B) AUC of losartan in combination with control or fluvoxamine, (C) AUC of omeprazole in combination with control, cimetidine or rifampicin, (D) AUC of dextromethorphan in combination with control, cimetidine, fluvoxamine or rifampicin. Values are presented as the mean \pm SD. Significance was determined using the Wilcoxon signed-rank tests, using a Bonferroni correction for multiple comparisons. The caffeine and omeprazole groups were significantly different at $p < 0.025$, the losartan group was significantly different at $p < 0.05$, and the dextromethorphan group was significantly different at $p < 0.017$.

AUC: area under the curve, cont: control, RFP: rifampicin, CIM: cimetidine, and FLV: fluvoxamine.

2-3-3 文献検索結果

PubMedにより文献検索を行った結果、最初のキーワード検索により1060件の報告が抽出された。次に、titleとabstractの内容で絞り込みを行った結果から、183件の研究を採用した。最終的に183件の報告のうち、18件の研究を選択した^{82,86,90-105} (Fig. 13)。

CYP基質薬とCYP誘導薬又は阻害薬の15の組み合わせのうち7つの組合せに関する文献が見つかった。しかし、dextromethorphanには、どの組み合わせでも基準を満たす報告は検索できなかった。

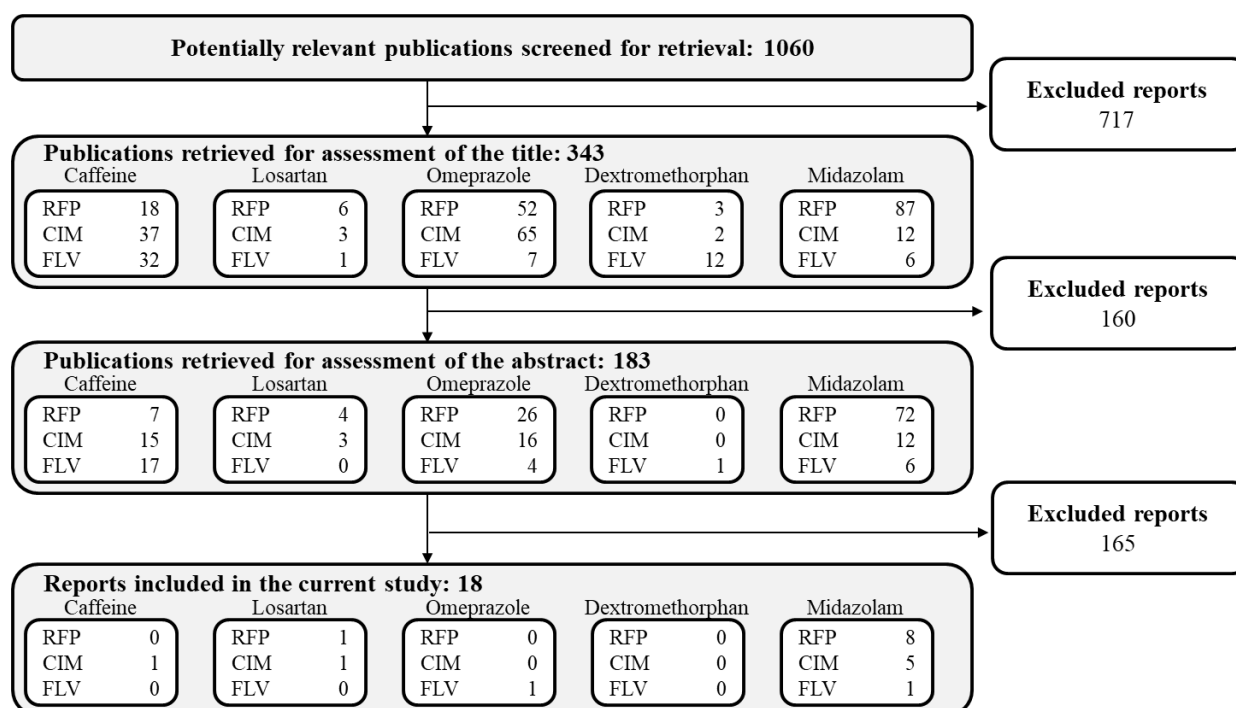


Fig. 13 Number of studies selected from the literature for drug interactions when using a single cytochrome P450 (CYP) probe drug and a CYP inhibitor or inducer. The numbers represent the number of studies selected from the literature.

RFP: rifampicin, CIM: cimetidine and FLV: fluvoxamine.

2-3-4 文献報告及び CYP 基質薬単独投与試験とカクテル試験の比較

カクテル試験及び CYP 基質薬単独投与試験と文献検索結果を Table 8 にまとめ、control 期と interaction 期の AUC 及び AUC 変動率を示した。Table 8 に示す CYP 基質薬単独投与の結果は、文献検索結果及び今回行った CYP 基質薬単独投与試験の結果を統合した結果である。文献報告及び CYP 基質薬単独投与試験の AUC 変動率と、カクテル試験の AUC 変動率に基づいて直線回帰を実施した (Fig. 14)。

CYP2C19 については遺伝的多型が報告されている¹⁰⁶⁾。採用文献では、omeprazole と fluvoxamine の組み合わせに関して、薬物動態パラメータが、extensive metabolizers (EM)、intermediate metabolizers (IM)、poor metabolizers (PM) の 3 つのグループに分けられて報告されている⁹³⁾。このため、今回のカクテル試験も同様の方法で分類し、既存の報告の結果と比較した⁸⁹⁾。

検索文献結果及び CYP 基質薬単独投与試験とカクテル試験の結果が等しい場合、直線回帰の傾きは 1 となるため、直線勾配が 1 に近づくほど、定量性評価が等しくなると考えられる。縦軸に基質薬単独投与試験における AUC 変動率と横軸にカクテル試験における AUC 変動率をプロットし、線形回帰を行った結果、直線の傾きは 1.231 であった。また相関係数は 0.959 と、両者の間に強い正の相関が認められた (Fig. 14)。

次に CYP 基質薬と CYP 誘導薬及び阻害薬の 17 の組み合わせについて、単独投与試験及びカクテル試験での AUC 変動率の相対的な違いを評価した (Fig. 15)。CYP 阻害薬と各基質の組み合わせ及び rifampicin 前投与における caffeine と losartan に関するプロットは AUC 変動率比=1 を基本として±50%以内であった (Fig. 15)。

Table 8 AUC and AUC change rate results of probe drugs in the cocktail study, single administration studies and studies selected from the literature.

Number	CYP probe drug	CYP inducer or inhibitor	Genotype of CYP2C19 ^a	Cocktail study			Literature or single administration study			Reference
				AUC control (ng·hr/mL)	AUC interaction (ng·hr/mL)	AUC change rate	AUC control (ng·hr/mL)	AUC interaction (ng·hr/mL)	AUC change rate	
1	Caffeine	Rifampicin			10700	0.91	9290	8630	0.94	This study
2	(CYP1A2)	Cimetidine		12000	15800	1.38	18900	31100	1.65	[90]
3		Fluvoxamine			18200	1.71	9290	16300	1.76	This study
4	Losartan	Rifampicin			128	0.58	349	225	0.64	[91]
5	(CYP2C9)	Cimetidine		224	217	1.00	791	931	1.18	[92]
6		Fluvoxamine			198	0.92	170	181	1.08	This study
7	Omeprazole	Rifampicin			195	0.18		325	0.12	This study
8	(CYP2C19)	Cimetidine		1380	2010	2.39	2130	2980	1.82	This study
9		Fluvoxamine	EM	582	1700	3.93	1480	7910	5.34	[93]
10			IM	1030	1880	1.92	4230	9570	2.26	[93]
11			PM	3920	4330	1.12	11500	13900	1.21	[93]
12	Dextromethorphan	Rifampicin			5.11	0.66		1.74	0.23	This study
13	(CYP2D6)	Cimetidine		11.1	22.6	2.47	6.36	15.3	2.55	This study
14		Fluvoxamine			10.1	1.11		10.5	1.33	This study
15	Midazolam	Rifampicin			0.577	0.05	214	35.3	0.10	[82,86,94-98, 105]
16	(CYP3A4)	Cimetidine		13.3	18.9	1.55	769	1120	1.42	[99-103]
17		Fluvoxamine			14.4	1.15	203	283	1.39	[104]

CYP: cytochrome P450, AUC: area under the curve.

^a Genetic polymorphisms of CYP2C19 divided into three groups of extensive metabolizers (EM), intermediate metabolizers (IM), and poor metabolizers (PM).

Each group of CYP2C19 gene polymorphism was n = 10 in the EM group, n = 5 in the IM group, and n = 4 in the PM group.

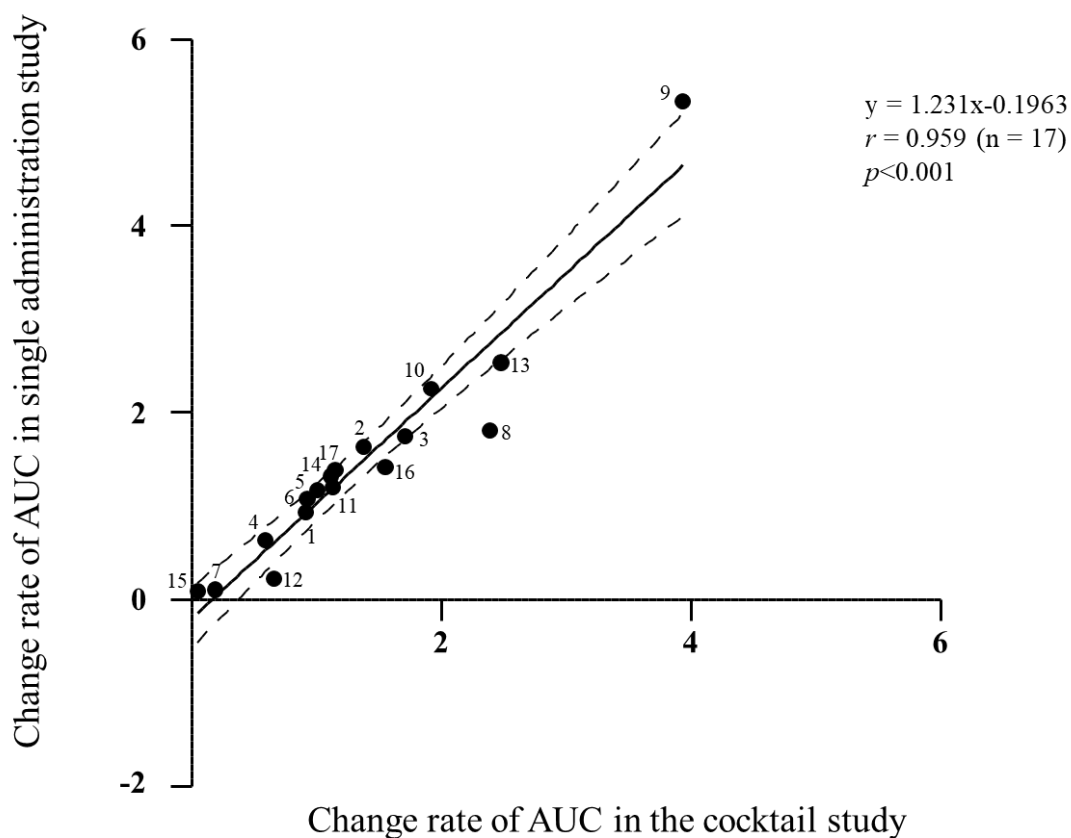


Fig. 14 Comparison of the change rate of the AUC in studies selected from the literature and single administration studies with that in the cocktail study.

Each point represents the value of each AUC change rate of a probe drug. The solid line shows the linear relationship between the ratio of the AUC from studies selected from the literature and single administration studies and that from the cocktail study, and the correlation coefficient (r) is 0.959 ($p < 0.001$). The points fit the linear equation, $y = 1.231x - 0.1963$, where y is the change rate of the AUC in the single administration study and x is the change rate of the AUC in the cocktail study. The dashed line shows the 95 percent confidence interval.

Each number indicates the following combination. 1: caffeine and rifampicin, 2: caffeine and cimetidine, 3: caffeine and fluvoxamine, 4: losartan and rifampicin, 5: losartan and cimetidine, 6: losartan and fluvoxamine, 7: omeprazole and rifampicin, 8: omeprazole and cimetidine, 9: omeprazole and fluvoxamine (extensive metabolizers for CYP2C19), 10: omeprazole and fluvoxamine (intermediate metabolizers for CYP2C19), 11: omeprazole and fluvoxamine (poor metabolizers for CYP2C19), 12: dextromethorphan and rifampicin, 13: dextromethorphan and cimetidine, 14: dextromethorphan and fluvoxamine, 15: midazolam and rifampicin, 16: midazolam and cimetidine, 17: midazolam and fluvoxamine.

CYP: cytochrome P450, AUC: area under the curve.

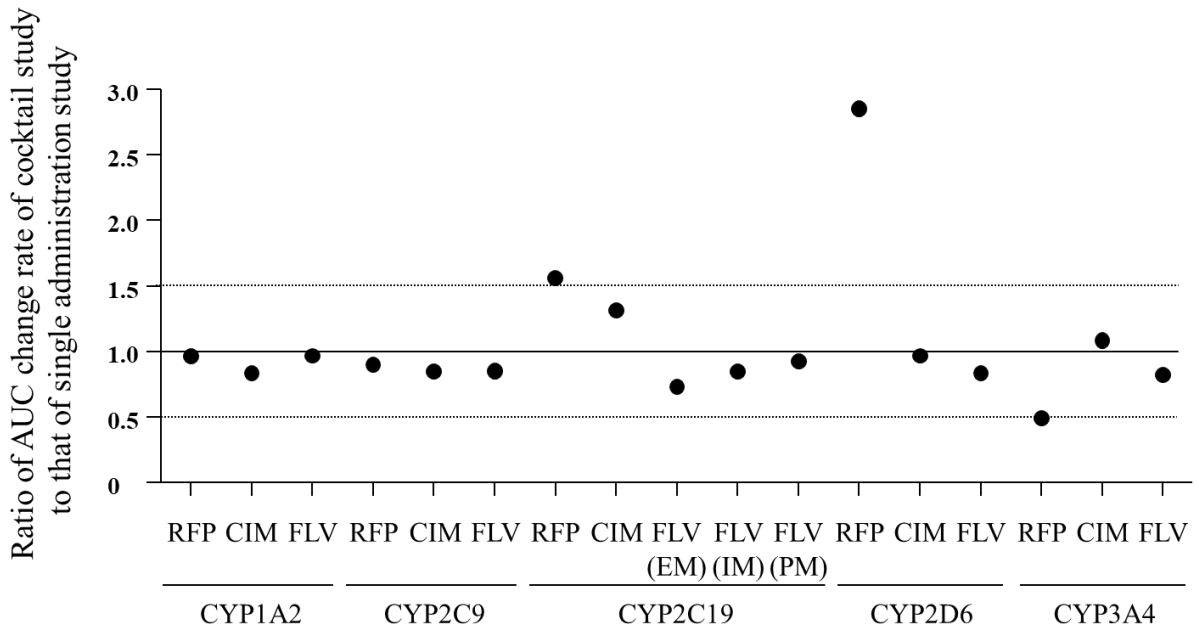


Fig. 15 Ratio of the AUC change rate of the cocktail study to that of single administration study in each cytochrome P450 (CYP) probe drug when combined with a CYP inducer or inhibitor. Each point represents the value of each ratio of the AUC change rate of the probe drug. AUC: area under the curve, RFP: rifampicin, CIM: cimetidine, FLV: fluvoxamine, EM: extensive metabolizers for CYP2C19, IM: intermediate metabolizers for CYP2C19, and PM: poor metabolizers for CYP2C19.

第4節 考察

カクテル試験は、複数の CYP 活性を網羅的に評価できる手法であり、薬物相互作用の検出法の1つとして挙げられる。しかし、これまでに CYP 誘導薬あるいは阻害薬による CYP 活性変動の程度を、基質薬の単独投与時とカクテル薬投与時において比較した報告はない。このためカクテル試験により薬物相互作用の定量的評価が可能であるかどうかは不明である。カクテル試験の定量的薬物相互作用検出法としての妥当性を検証することを目的とし、カクテル薬投与時と CYP 基質薬 (CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4) 単独投与時との活性変動の程度を比較した。

文献報告と単独投与試験の結果は CYP 基質薬単独投与結果として統合し、カクテル試験の結果と比較した。CYP 基質薬単独投与試験及びカクテル試験による AUC 変動率をもとに直線回帰を実施した結果、得られた傾きは 1.231 であり、強い正の相関が認められた (Fig. 14)。“Karolinska cocktail” を用いた報告では、control 群のカクテル薬投与時の血漿中薬物濃度と、CYP 基質薬単独投与時の血漿薬物濃度の推移に関して同一被験者を対象として比較した⁴⁰⁾。その結果、相関係数が 0.82–0.93 であり、高い相関関係が認められたと報告しているが、カクテル試験と基質薬単独投与試験の CYP 活性変動による薬物相互作用に関しては比較を行っていない。

本論では、初めて CYP 活性変動により生じた薬物相互作用をカクテル試験による評価と CYP 基質薬単独投与試験による評価の両試験の結果を用いて比較検討することで、カクテル試験による定量的な薬物相互作用評価の妥当性について明らかにした。

今回実施した CYP 基質薬単独投与試験結果と複数文献の結果を統合し、CYP 基質薬単独投与試験の結果としているため各試験における被験者は様々である。異なる被験者であるにも関わらず、基質薬単独投与試験とカクテル試験の AUC 変動率の間の相関係数は 0.959 と高い値が得られた。この結果から、両試験 (カクテル試験及び基質薬単独投与試験) の間に強い相関関係が認められると考えられた。さらに、CYP 基質薬単独投与の結果とカクテル試験の結果から得られた AUC 変動率比についても調査した。Rifampicin と 3 つの CYP 基質薬 (omeprazole、dextromethorphan、midazolam) の組み合わせを除いて、AUC 変動率比は±50% 以内であった (Fig. 15)。

本論では併用薬として cimetidine、fluvoxamine 又は rifampicin を使用した。これらは典型的な CYP 阻害又は誘導作用をもつ薬剤である。その結果、カクテル試験における AUC 変動率は、CYP 基質薬単独投与試験の AUC 変動率とほぼ同様であると考えられた。今後、さらなる研究として他の CYP 阻害薬や誘導薬での CYP 活性変動について検証する必要があると考えられる。

CYP 基質薬単独投与試験として 24 人の健常人を対象に臨床試験を実施し、cimetidine、fluvoxamine 又は rifampicin 前投与による各基質薬の CYP 活性変動を評価した。この単独投与試験での各基質薬の薬物血漿中濃度プロファイルと AUC 変化は、カクテル試験の結果と同様の傾向を示した。

Cimetidine 前投与による CYP2C19 及び 2D6 阻害作用については、すでに報告されている^{77,78)}。

カクテル試験及び単独投与試験においても同様の結果が得られた。これらの結果から、カクテル試験において、cimetidine による CYP2C19 及び 2D6 阻害効果を基質薬単独投与試験の結果と同様に反映していることが示された (Table 8)。

また fluvoxamine による CYP1A2 阻害作用についても、すでに報告がある¹⁰⁷⁾。カクテル試験及び単独投与試験どちらの試験においても CYP1A2 については同様の結果が観察された (Table 8)。

Omeprazole と fluvoxamine の組み合わせに関して採用した文献データは遺伝子多型によって分類されており、カクテル試験も同様に分類を行い、文献データと比較した。CYP2C19 の遺伝子多型をカクテル試験の被験者で調査したところ、PM の割合は 21%であった⁸⁹⁾。以前の研究で、日本人の CYP2C19 遺伝子多型について、EM 又は PM に分けた際の PM の割合は約 20%であったとの報告がある^{108,109)}。カクテル試験では、PM の割合は以前の報告と同程度であった。また遺伝子多型により分類された omeprazole の各 AUC 変動率は、カクテル試験結果と文献結果で類似しており、両試験で大きな差は認められなかった⁹³⁾ (Table 8)。

Rifampicin には CYP2C19 誘導作用があることはすでに知られている¹¹⁰⁾。カクテル試験と単独投与試験の両方で、rifampicin 併用により omeprazole の AUC は減少した。これらの結果から、カクテル試験と CYP 基質薬単独投与試験の両試験において rifampicin の CYP2C19 誘導効果を確認することができた。しかしながら、rifampicin 前投与によるカクテル試験の AUC 変動率と単独投与試験の AUC 変動率の差として 57%の違いが認められた。このためカクテル試験では rifampicin 併用による CYP 活性変動の程度を基質薬単独投与試験と同様に評価することは難しい可能性が考えられた。

これまでに rifampicin には CYP2D6 誘導作用はないという報告があるが、両試験において rifampicin 併用により dextromethorphan の AUC の低下が認められた¹¹¹⁾。これは dextromethorphan が CYP3A4 により N-脱メチル化体に代謝されるため、その影響によるものだと考えられる¹¹²⁾。このため、dextromethorphan による CYP2D6 活性を評価するためには、dextromethorphan の代謝物の血漿中濃度を評価する必要があると考えられた。

さらに rifampicin による CYP3A4 誘導作用は広く知られている¹¹⁰⁾。文献検索の結果、rifampicin と midazolam の組み合わせに関するデータを 8 つの文献から抽出した^{82,86,94-98,105)}。各文献より算出した rifampicin 併用時の midazolam の AUC 変動率はカクテル試験の AUC 変動率よりも高値であった。これは採用した論文の被験者の違いや試験プロトコールの違いによる影響を受けた可能性がある。8 つもの文献をまとめたデータと比較し、その差が約 50%であることを考慮すると、カクテル試験と単独投与試験による rifampicin 誘導効果の評価に大きな差はない可能性がある。

今回のカクテル試験及び基質薬単独投与試験では被験者が異なる。さらに既存の報告を参考にしたデータに関しては、そのプロトコールや薬物投与量、人種などの違いがあることを考慮する必要がある。しかし、これらの制約がありながら、カクテル試験の結果と単独投与試験の結果との間に良好な相関関係が認められた。

以上の結果から、今回カクテル試験で、CYP 基質薬単独投与の場合のように、CYP 阻害による AUC 変動率を評価できた。一部の基質薬 (CYP2C19、2D6、3A4) では、rifampicin によ

る CYP 誘導効果についてはさらなる調査が必要であると考えられたが、カクテル試験と基質薬単独投与試験の間には有意な相関が認められた。カクテル試験は、包括的に薬物相互作用の検出及び定量的な評価方法として適切であると考えられた。

第3章 カクテル試験での1ポイント採血における血漿中濃度とAUC及び血漿中濃度代謝比と経ロクリアランスの関係

第1節 序論

CYP基質薬のAUCやCLといった薬物動態パラメータを算出するためには、頻回採血や試験中の拘束など被験者に大きな負担をかけ、各基質薬の薬物動態を解析する必要がある。また複数のCYP基質薬を同時に投与し、網羅的にCYP活性評価が可能であるカクテル試験を用いても、カクテル薬の薬物動態を解析するために頻回採血が必要である。

このため侵襲性を軽減するために採血回数を減らし、被験者への負担を軽減した評価法が試みられてきた^{48,49)}。近年、カクテル試験のデータをレトロスペクティブに評価し、limited-point sampling法について検証が行われ、3回の採血を用いて基質薬の評価が行えることが報告された¹¹³⁾。カクテル試験においても採血回数を減らした侵襲性の低い検体採取法の利用が可能であれば、カクテル試験の実用性がさらに増すと考えられる。これまでのカクテル試験では侵襲性を少なくするためにCYP基質薬ごとに最適な採血時間や検体について評価を行っているが、全ての基質薬のAUCやCLを1点採血で評価できる方法に関する報告は少ない^{42,49,55)}。またInje cocktailを用いてCYP誘導及び阻害の影響も含めた1点採血によるAUC及びCL/F予測評価法について検討した報告はない。

前章においてカクテル試験による相互作用評価の妥当性が述べられたが、薬物動態パラメータの評価には頻回採血が必要であった。また第1章ではCYP3A4基質薬のmidazolamのみを用いて1点採血による侵襲性の低いCYP活性評価法の検討を行った。そこで第3章では5つのCYP基質薬を同時に投与したカクテル試験による低侵襲なCYP活性及び相互作用評価のための臨床試験法の確立を目的にCYP誘導及び阻害の影響も含めたAUC及びCL/F予測が1点採血により可能であるか検討した。

第2節 方法

3-2-1 試験方法

すでに報告されている Inui らのカクテル試験と第2章のカクテル試験の結果をもとに解析を行った⁴⁵⁾。健康成人男性32名(年齢 27.3 ± 5.9 歳、体重 66.8 ± 9.7 kg)を対象とし、2つの臨床試験結果を解析した。両試験とも被験者は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。試験は浜松医科大学の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。

Inui らの試験では、健康成人男性13名を対象とした⁴⁵⁾。Caffeine、losartan、omeprazole、dextromethorphan、midazolam を各 CYP 基質薬として使用した。被験者は rifampicin (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 0)、終了4日目 (Day 4)、終了8日目 (Day 8) にカクテル試験を行った。カクテル試験において、被験者は caffeine 100 mg、losartan 50 mg、omeprazole 20 mg、dextromethorphan 30 mg、midazolam 15 μ g/kg を同時に服用した。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 とした。血液より血漿検体を分離し -70°C で測定まで保存した。

2つ目の試験は第2章のカクテル試験であり、2-2-2と同様である。

データは、各基質薬及び代謝物において血漿中濃度 1024 ポイントを用いた。

3-2-2 血漿中の薬物及び代謝物濃度測定

血漿中の caffeine、losartan、omeprazole、dextromethorphan、midazolam 及び各代謝物である paraxanthine、E-3174、5-hydroxyomeprazole、dextrophan、1'-hydroxymidazolam 濃度は LC-MS/MS 法により測定した。2-2-4と同様の方法で実施した⁸⁸⁾。

3-2-3 薬物動態学的パラメータ解析

各基質薬及びその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行った。各基質薬の AUC_{0-t} 、 CL/F 及び血漿中濃度代謝比は 1-2-2-1と同様の方法で算出した。

3-2-4 クロスバリデーション法による予測性解析

128回の投与データを用いて、1-2-2-2と同様の方法でMPE、MAE及びRMSEを算出した⁶⁹⁾。

3-2-5 統計解析

統計解析は GraphPad Prism software (version 5.0; GraphPad, San Diego, CA, USA) を用いて行った。 AUC_{0-t} と各採血ポイントにおける血漿中基質薬濃度の間で、最小二乗法を用いて直線回帰を行った。 CL/F と各基質薬の血漿中濃度代謝比についても同様の解析を行った。相関性の有意性検定はピアソンの相関係数検定法に従った。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 結果

3-3-1 各基質薬の血漿中濃度と AUC の関係

Caffeine に関しては全ての採血ポイントにおいて血漿中 caffeine 濃度と AUC の間に有意な相関が認められた。投与後 1 時間から 8 時間の決定係数は >0.8 と高値であり、投与後 4 時間における決定係数が最も高値であった ($r^2 = 0.965$) (Fig. 16、Table 9)。血漿中 losartan と losartan の AUC の関係について検討したところ、全ての採血ポイントにおいて両者の間に有意な相関が認められた。投与後 2-4 時間の決定係数は 0.5 以上であった (Fig. 17、Table 9)。血漿中 omeprazole 濃度は投与後 1 時間から 8 時間において AUC と有意な正の相関を示した。投与後 4 時間の両者の決定係数が 0.773 と最大となった (Fig. 18、Table 9)。Dextromethorphan の血漿中濃度と AUC についても全ての採血ポイントで有意な相関が認められた。投与後 4 時間と 6 時間の決定係数は 0.93 以上と高値であった (Fig. 19、Table 9)。Midazolam の血漿中濃度は全ての採血ポイントで AUC と有意な正の相関を示した。投与後 1.5 時間から 6 時間の決定係数は 0.8 以上であった (Fig. 20、Table 9)。

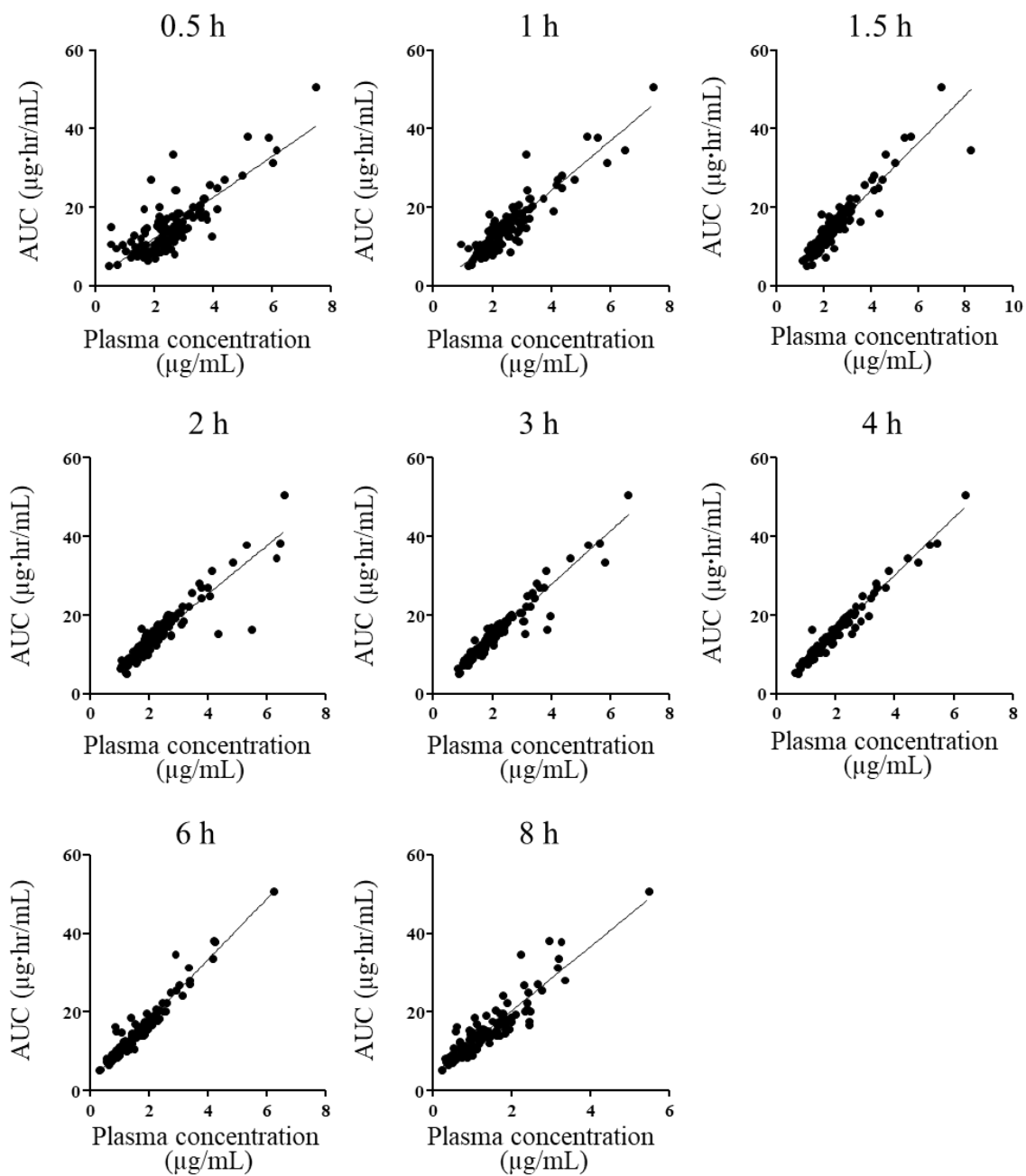


Fig. 16 The relationship between the plasma concentrations of caffeine at 0.5–8 h and the area under the curve (AUC) of caffeine after the oral administration of cocktail drug. Each point represents the value of each volunteer.

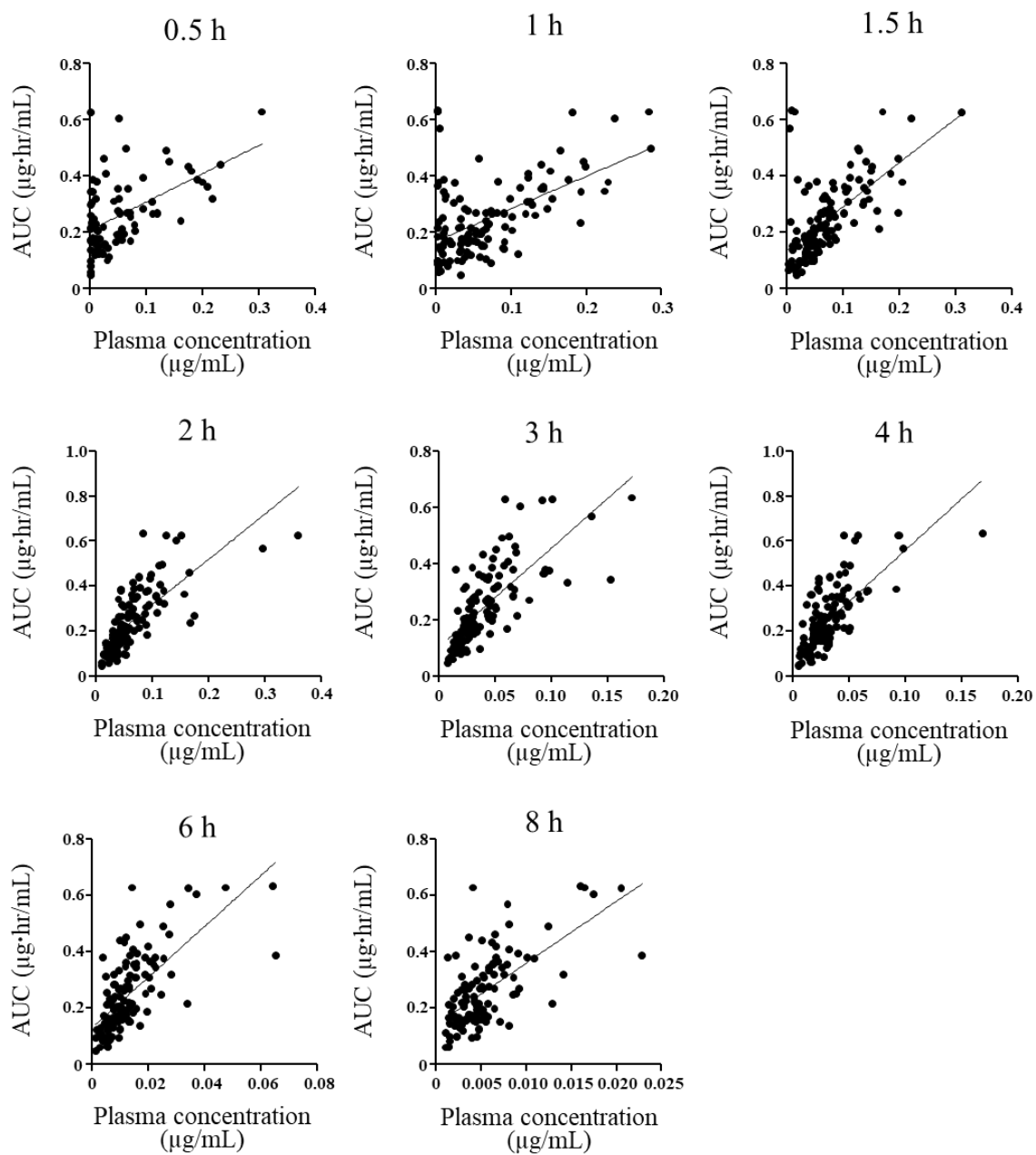


Fig. 17 The relationship between the plasma concentrations of losartan at 0.5–8 h and the area under the curve (AUC) of losartan after the oral administration of cocktail drug. Each point represents the value of each volunteer.

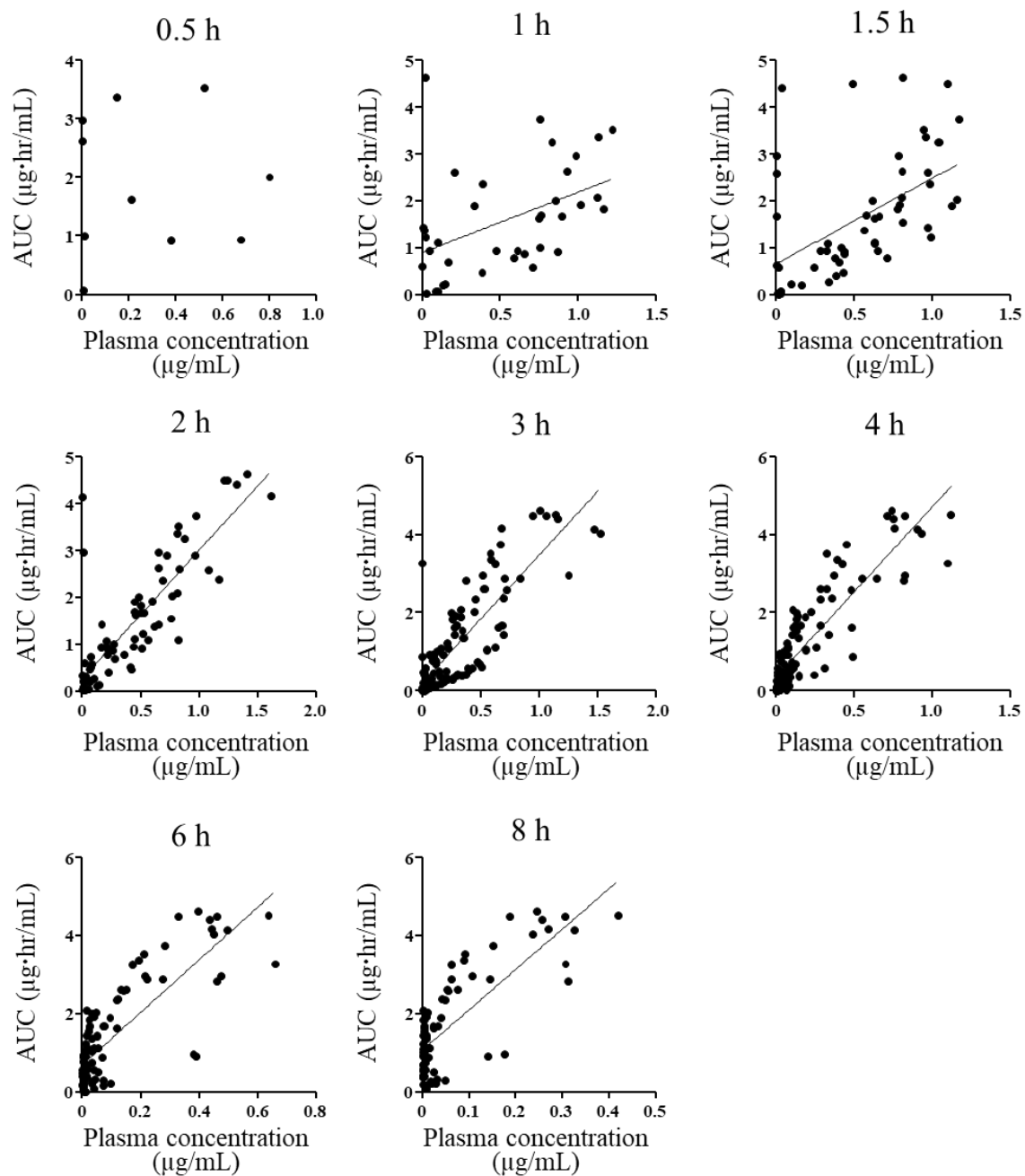


Fig. 18 The relationship between the plasma concentrations of omeprazole at 0.5–8 h and the area under the curve (AUC) of omeprazole after the oral administration of cocktail drug. Each point represents the value of each volunteer.

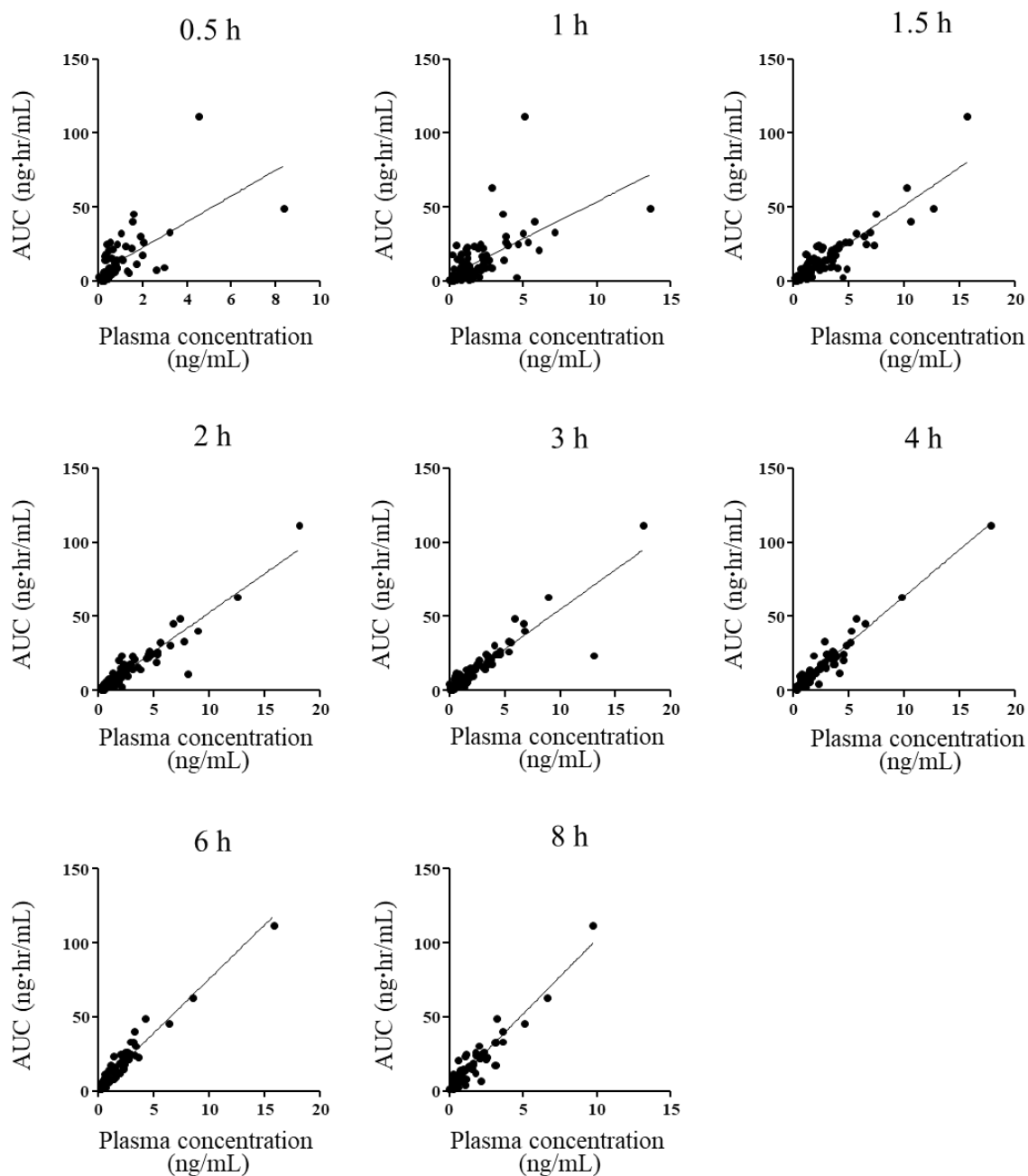


Fig. 19 The relationship between the plasma concentrations of dextromethorphan at 0.5–8 h and the area under the curve (AUC) of dextromethorphan after the oral administration of cocktail drug. Each point represents the value of each volunteer.

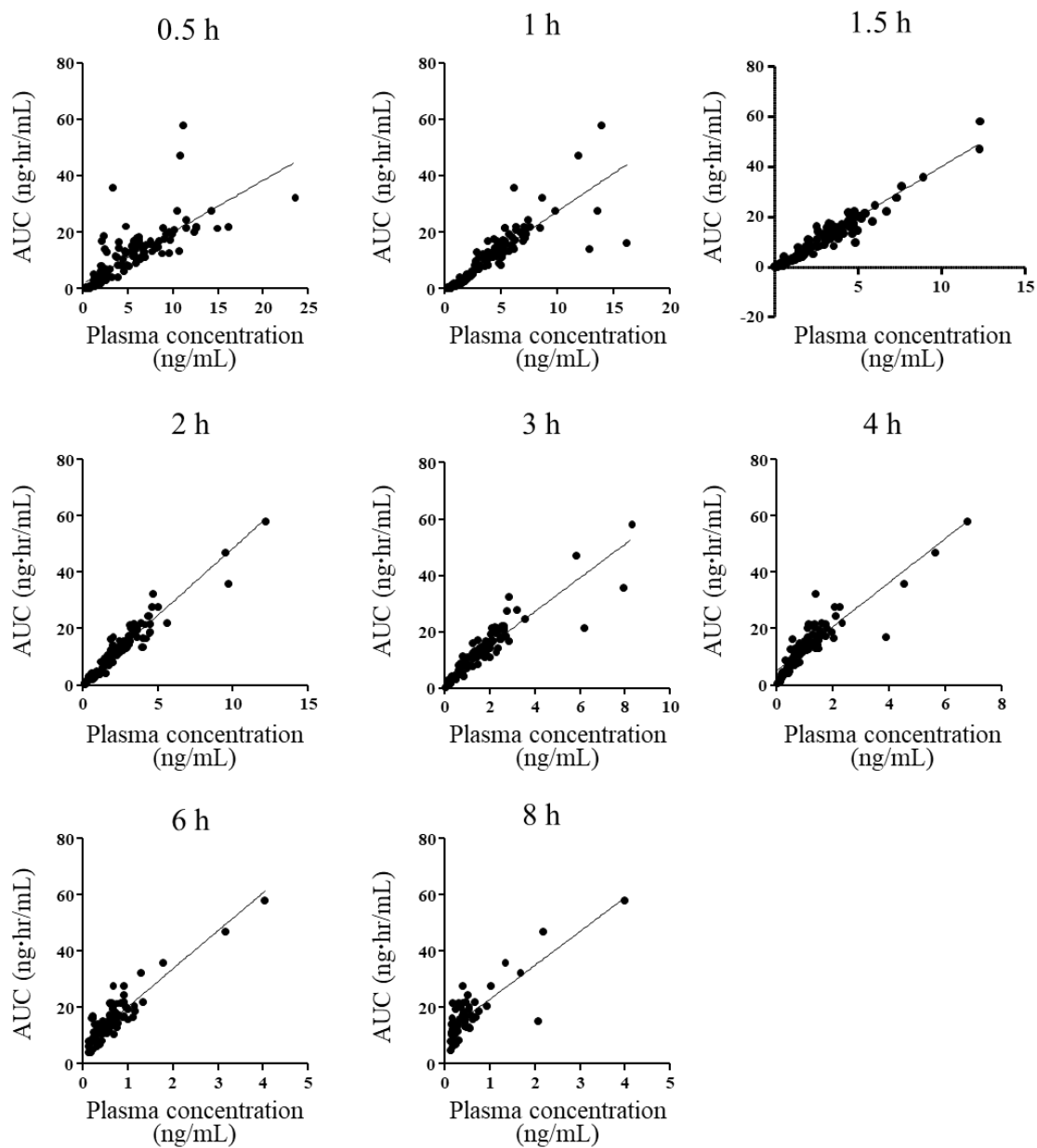


Fig. 20 The relationship between the plasma concentrations of midazolam at 0.5–8 h and the area under the curve (AUC) of midazolam after the oral administration of cocktail drug. Each point represents the value of each volunteer.

Table 9 Coefficient of determination (r^2) of each cytochrome P450 substrate (caffeine, losartan, omeprazole, dextromethorphan, midazolam) in the relationship between plasma concentrations vs. area under the curve (AUC) and metabolic ratio in plasma vs. oral clearance (CL/F) at each sampling point after the oral administration of a cocktail drug.

	Time (hr)	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0	6.0	8.0
Plasma concentration vs. AUC									
Caffeine	r^2	0.665	0.836	0.866	0.847	0.923	0.965	0.936	0.841
	p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Losartan	r^2	0.269	0.308	0.384	0.543	0.531	0.512	0.468	0.416
	p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Omeprazole	r^2	0.000	0.205	0.275	0.702	0.703	0.773	0.657	0.614
	p	0.972	0.005	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Dextromethorphan	r^2	0.424	0.396	0.827	0.897	0.843	0.936	0.936	0.897
	p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Midazolam	r^2	0.605	0.742	0.942	0.923	0.833	0.811	0.813	0.669
	p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Mean of r^2 in the substrates		0.392	0.497	0.659	0.782	0.767	0.799	0.762	0.687
Metabolic ratio in plasma vs. CL/F									
Caffeine	r^2	0.000	0.024	0.091	0.143	0.135	0.182	0.202	0.111
	p	0.985	0.085	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Losartan	r^2	0.132	0.000	0.008	0.010	0.033	0.021	0.005	0.000
	p	<0.001	0.988	0.302	0.256	0.041	0.105	0.426	0.854
Omeprazole	r^2	0.794	0.896	0.793	0.641	0.476	0.472	0.073	0.165
	p	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.010	<0.001
Dextromethorphan	r^2	0.683	0.232	0.190	0.122	0.517	0.287	0.370	0.280
	p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Midazolam	r^2	0.007	0.013	0.235	0.341	0.567	0.403	0.004	0.114
	p	0.368	0.211	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.707	0.589
Mean of r^2 in the substrates		0.323	0.233	0.264	0.252	0.346	0.273	0.131	0.292

The p value was calculated using Pearson correlation coefficients.

3-3-2 各基質薬の血漿中濃度代謝比と経口クリアランスの関係

Table 9 に全ての採血時間における各基質薬の血漿中濃度代謝比と CL/F の決定係数を示した。

血漿中 caffeine 代謝比は投与後 1.5 時間から 8 時間において CL/F と正の相関を示した。両者の決定係数は投与後 6 時間で最大となった ($r^2 = 0.202$) (Table 9、Fig. 21)。Losartan の血漿中濃度代謝比は投与後 0.5 時間及び 3 時間のみ CL/F と有意な相関を示した (Table 9、Fig. 22)。Omeprazole に関して血漿中濃度代謝比と CL/F の関係を検討した結果、全ての採血ポイントで両者の間に有意な相関が認められ、投与後 0.5–2 時間における決定係数は 0.6 以上であった (Table 9、Fig. 23)。血漿中 dextromethorphan 代謝比は CL/F と全ての採血ポイントで有意な相関を示した。投与後 0.5 時間及び 3 時間の決定係数は 0.5 以上であった (Table 9、Fig. 24)。Midazolam 投与後 1.5 時間から 4 時間の midazolam の血漿中濃度代謝比と CL/F の間に有意な相関が認められ、投与後 3 時間の決定係数が最大となった ($r^2 = 0.567$) (Table 9、Fig. 25)。

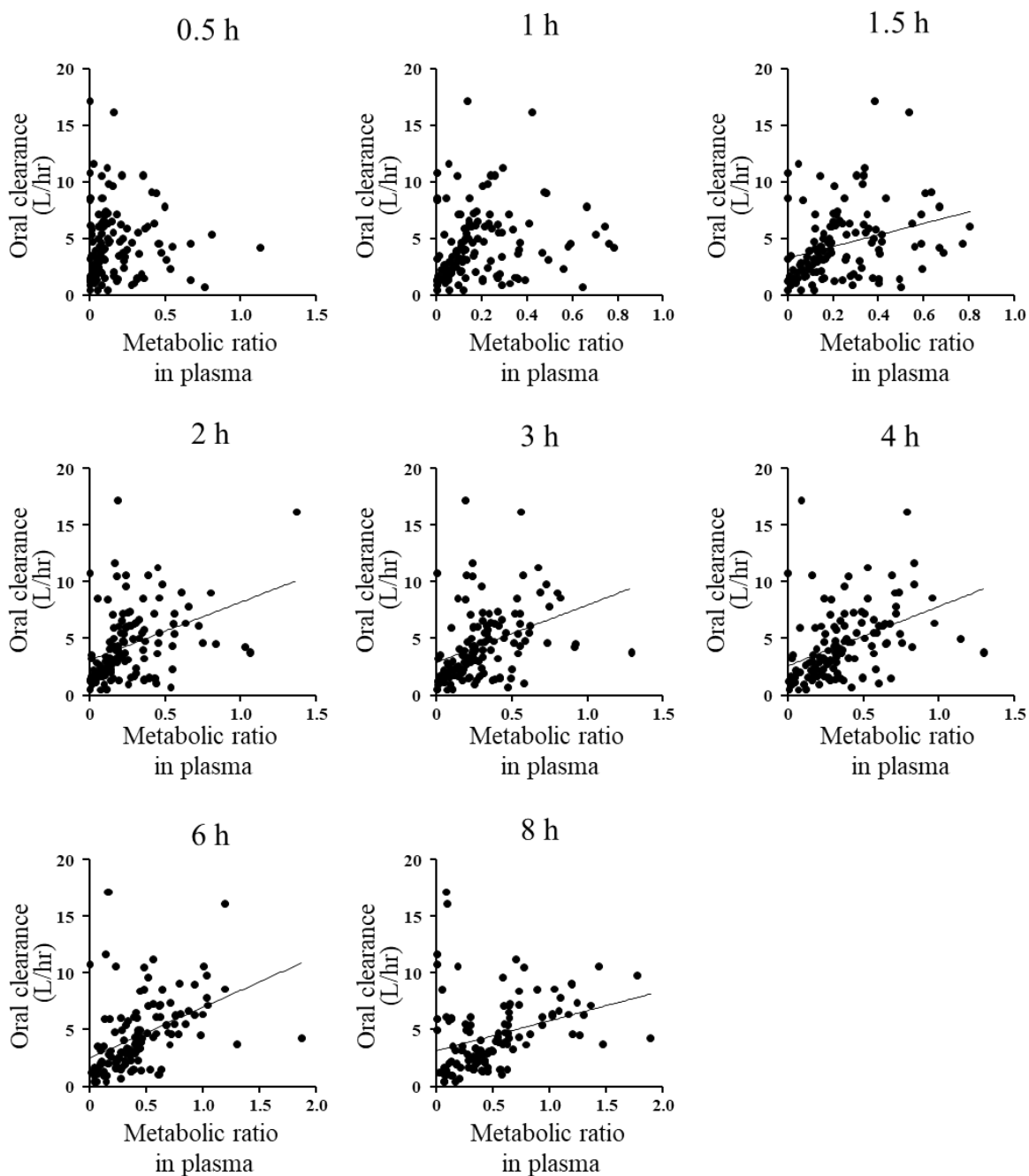


Fig. 21 The relationship between the metabolic ratio in plasma at 0.5–8 h and the oral clearance of caffeine after the oral administration of cocktail drug. Each point represents the value of each volunteer. The metabolic ratio in plasma were calculated by paraxanthin/caffeine, E-3174/losartan, 5-hydroxyomeprazole/omeprazole, dextrophan/dextromethorphan, and 1'-hydroxymidazolam/midazolam, respectively.

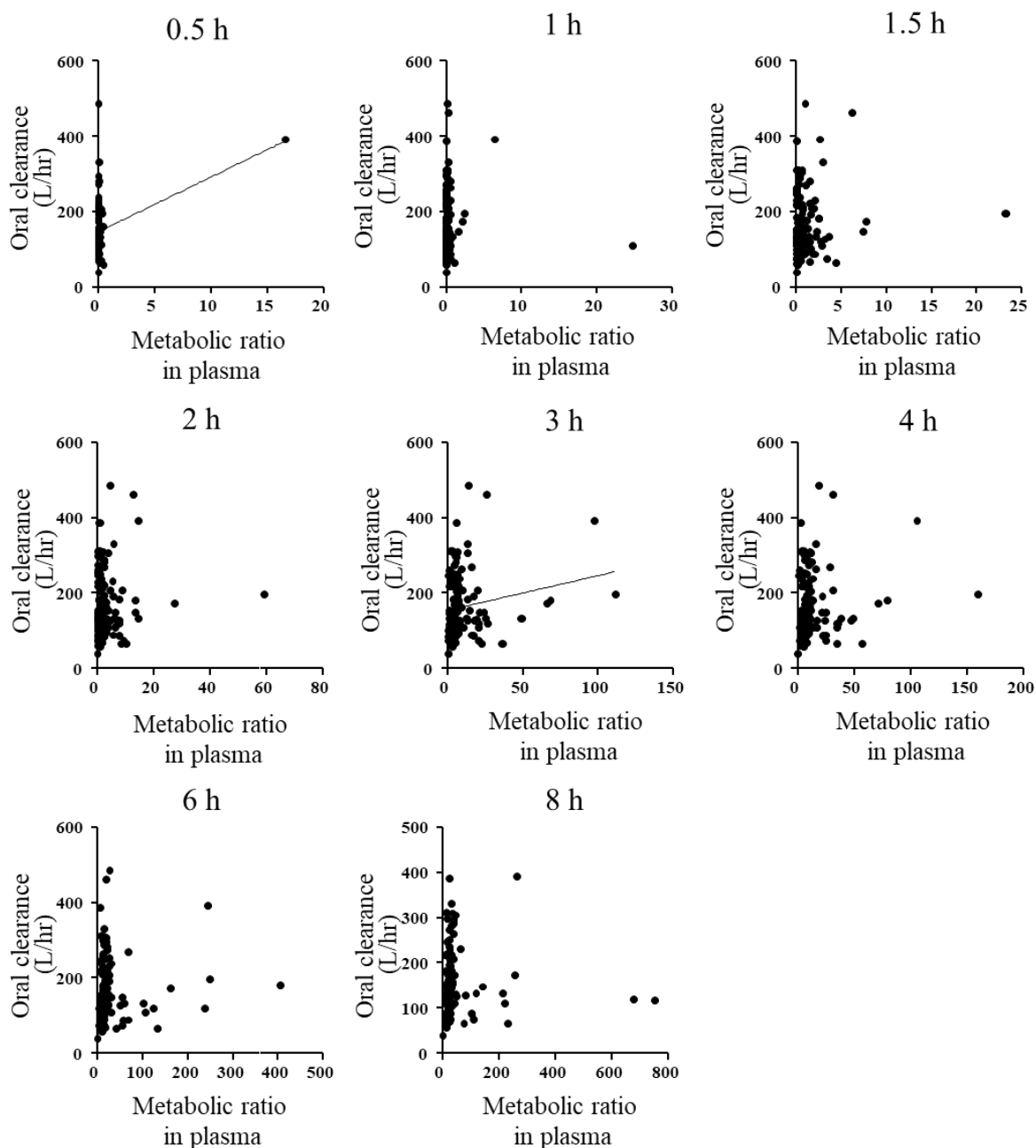


Fig. 22 The relationship between the metabolic ratio in plasma at 0.5–8 h and the oral clearance of losartan after the oral administration of cocktail drug. Each point represents the value of each volunteer. The metabolic ratio in plasma were calculated by paraxanthin/caffeine, E-3174/losartan, 5-hydroxyomeprazole/omeprazole, dextrophan/dextromethorphan, and 1'-hydroxymidazolam/midazolam, respectively.

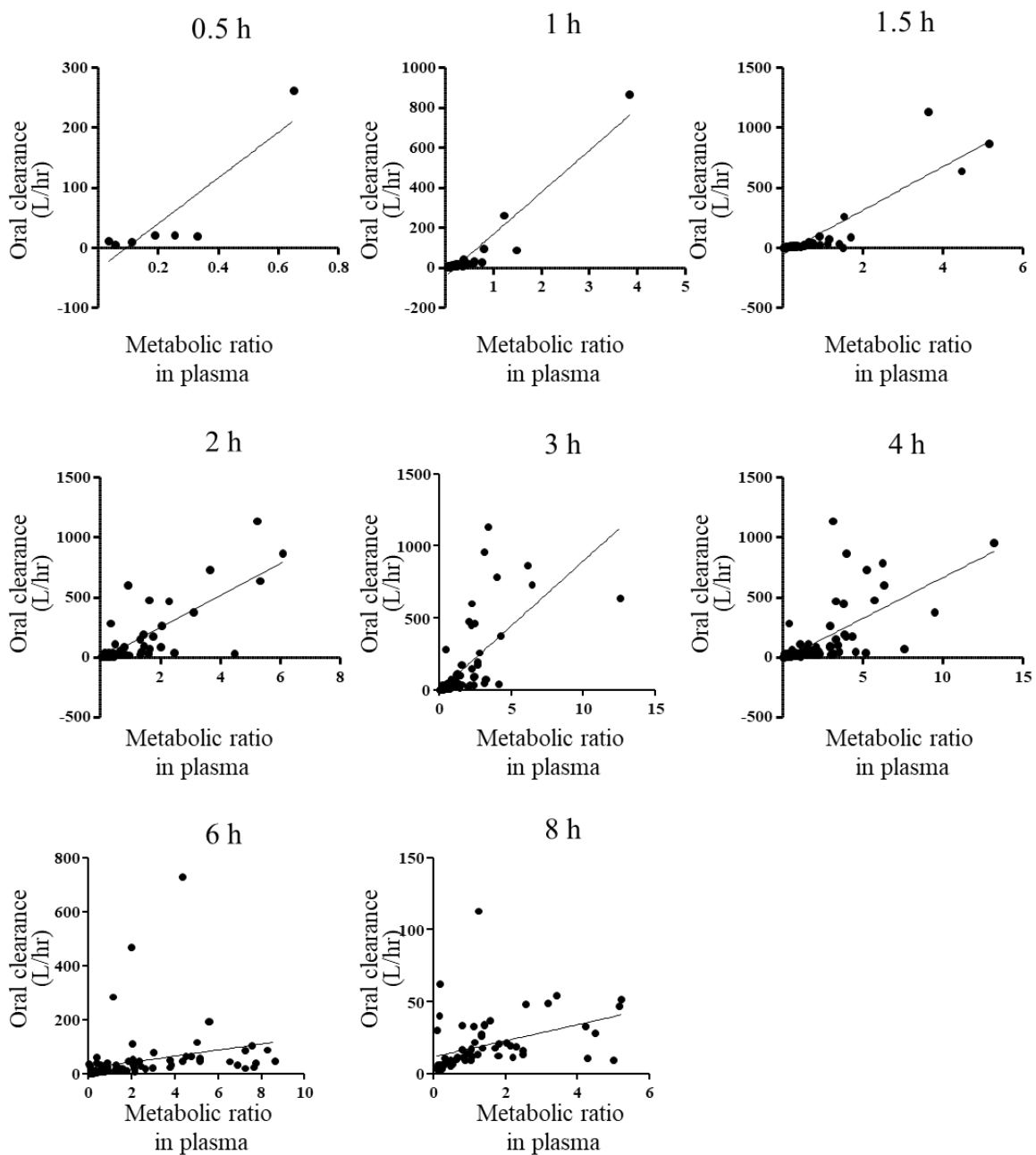


Fig. 23 The relationship between the metabolic ratio in plasma at 0.5–8 h and the oral clearance of omeprazole after the oral administration of cocktail drug. Each point represents the value of each volunteer. The metabolic ratio in plasma were calculated by paraxanthin/caffeine, E-3174/losartan, 5-hydroxyomeprazole/omeprazole, dextrophan/dextromethorphan, and 1'-hydroxymidazolam/midazolam, respectively.

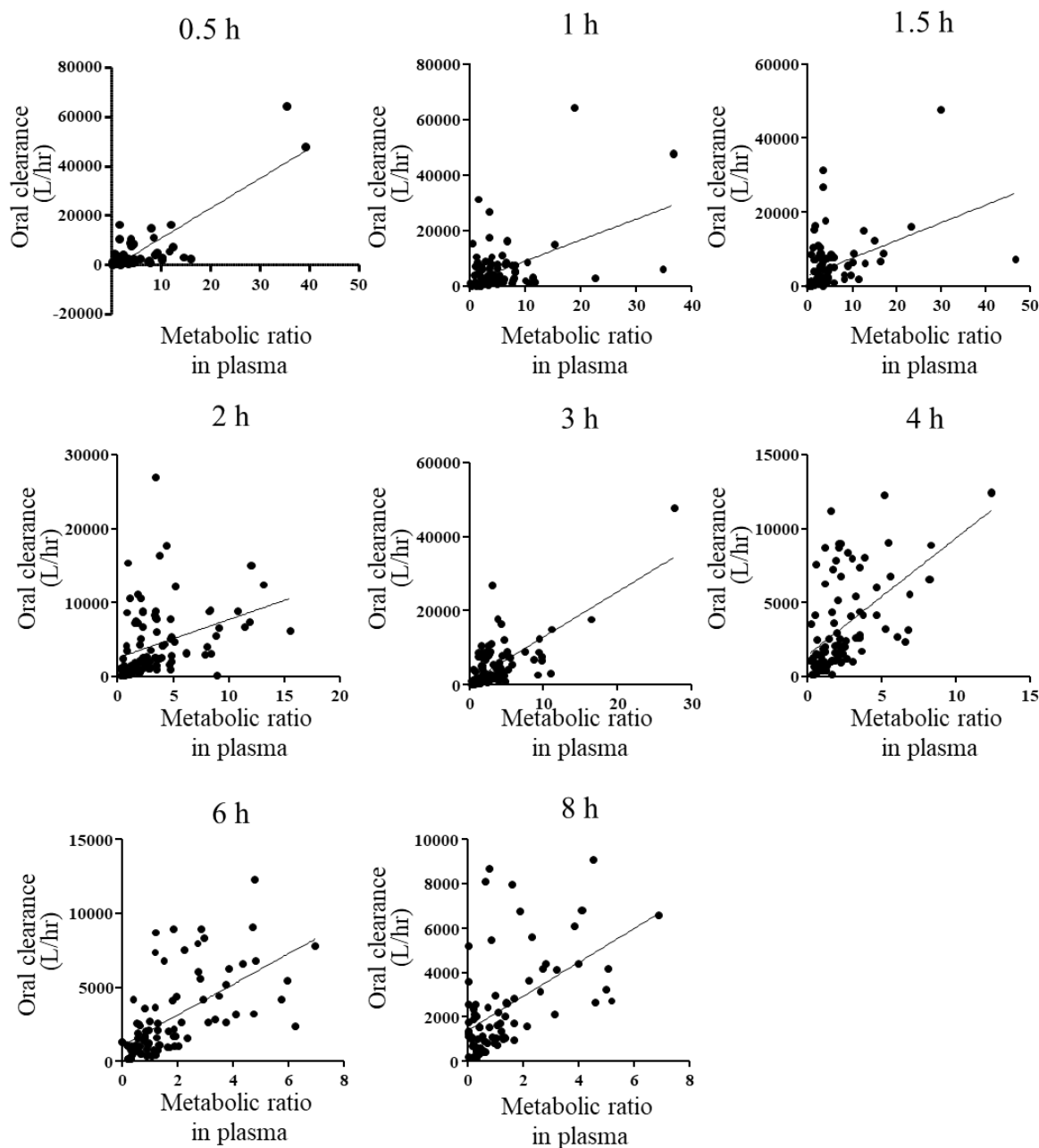


Fig. 24 The relationship between the metabolic ratio in plasma at 0.5–8 h and the oral clearance of dextromethorphan after the oral administration of cocktail drug. Each point represents the value of each volunteer. The metabolic ratio in plasma were calculated by paraxanthin/caffeine, E-3174/losartan, 5-hydroxyomeprazole/omeprazole, dextrophan/dextromethorphan, and 1'-hydroxymidazolam/midazolam, respectively.

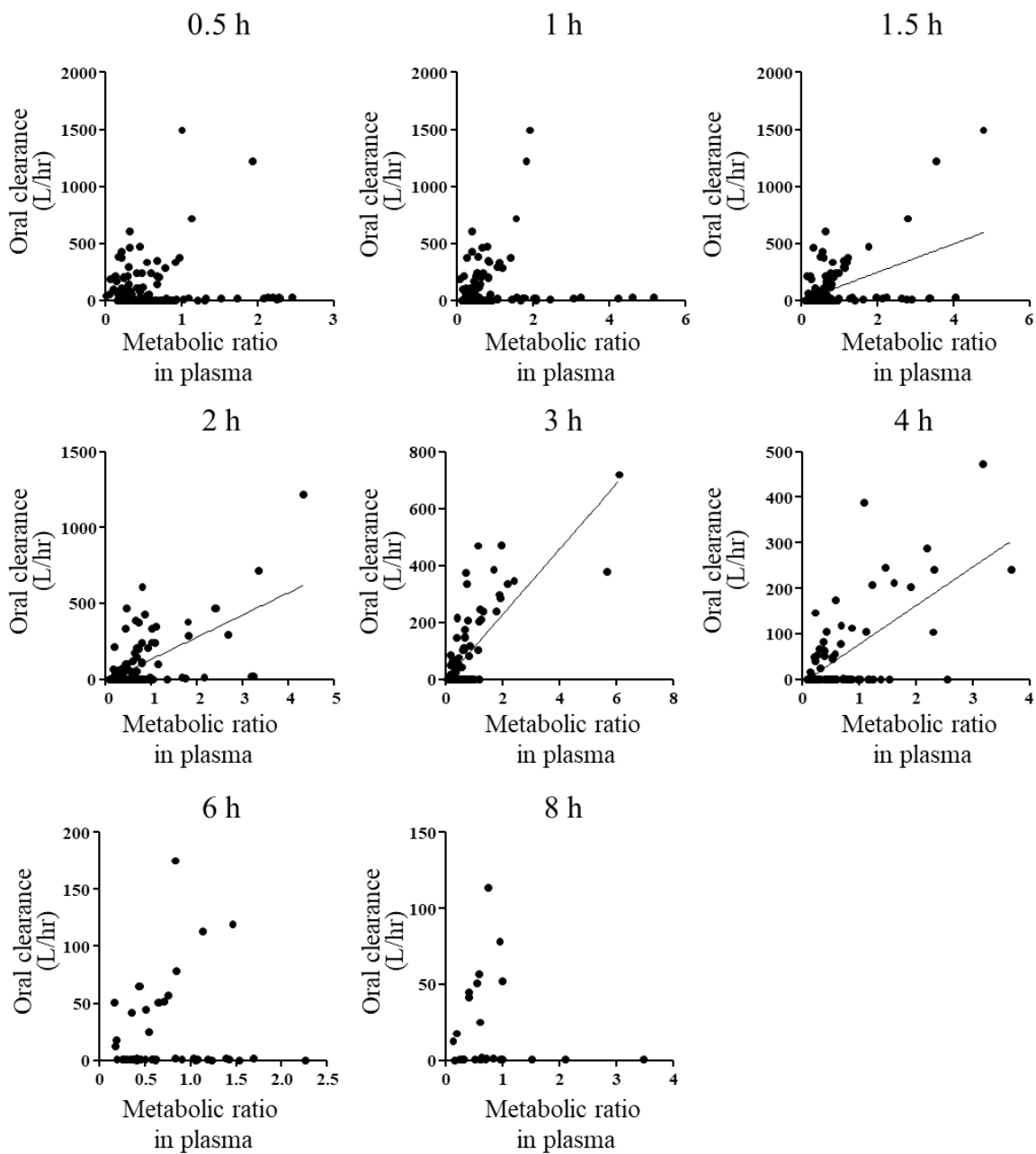


Fig. 25 The relationship between the metabolic ratio in plasma at 0.5–8 h and the oral clearance of midazolam after the oral administration of cocktail drug. Each point represents the value of each volunteer. The metabolic ratio in plasma were calculated by paraxanthin/caffeine, E-3174/losartan, 5-hydroxyomeprazole/omeprazole, dextrophan/dextromethorphan, and 1'-hydroxymidazolam/midazolam, respectively.

3-3-3 1 ポイント採血の最適ポイントの検証

各基質薬の血漿中濃度又は代謝比と AUC 又は CL/F との決定関係が最大となる採血時間に違いが認められた。各基質薬の血漿中濃度と AUC の決定係数と血漿中濃度代謝比と CL/F の決定係数を比較すると、血漿中基質薬濃度と AUC の決定係数の方が高値を示す傾向が認められた。さらに各採血時間における各基質薬の血漿中濃度と AUC の決定係数の平均を調べたところ、投与後 4 時間の平均値が最大となった ($r^2 = 0.799$) (Table 9)。

Fig. 26 はカクテル薬投与後 4 時間の各基質薬の血漿中濃度を用いた予測 AUC と各基質薬の実測 AUC との関係を示した。投与後 4 時間における血漿中濃度を用いた AUC 予測バイアス、精度に関しては、caffeine、losartan、dextromethorphan、midazolam の MPE、MAE、RMSE は、それぞれ 0.8–26.1%、6.0–40.3%、8.8–98.7% の範囲であった。Omeprazole 投与後 4 時間の血漿中濃度の AUC 予測バイアス、精度は他の基質と比べて高値であった (Table 10)。

カクテル薬投与後 4 時間の各基質薬の血漿中濃度代謝比を用いた予測 CL/F と各基質薬の実測 CL/F との関係を示した。CL/F の予測に関する MPE、MAE、RMSE は Omeprazole を除き、AUC 予測に関する MPE、MAE、RMSE より高値であった (Table 10)。

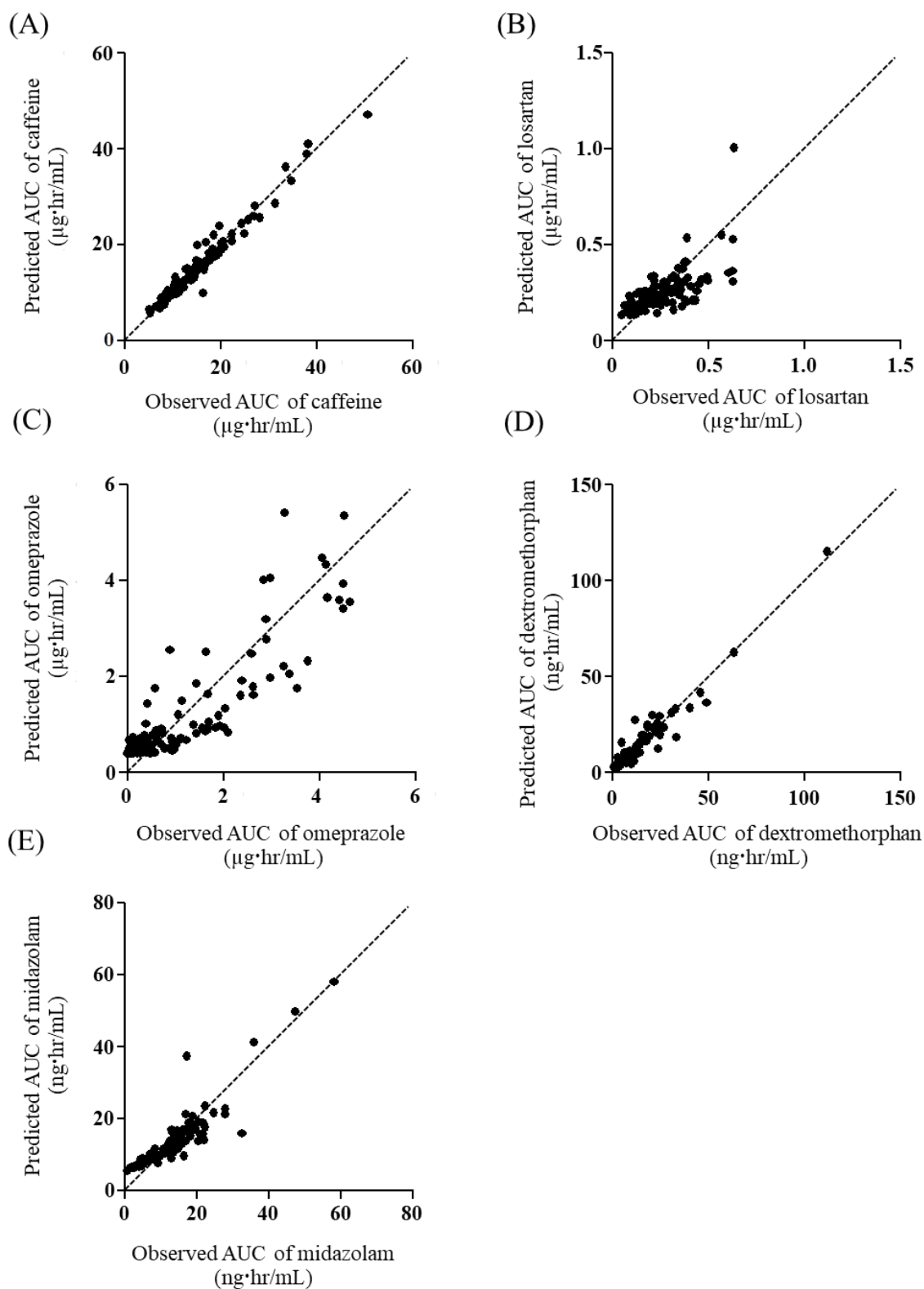


Fig. 26 The relationship between the observed area under the curve (AUC) and predicted AUC from the plasma concentrations of caffeine (A), losartan (B), omeprazole (C), dextromethorphan (D), and midazolam (E) at 4 h after the administration of the cocktail drug. Each point represents the value for each volunteer. The dashed line shows, $y = x$, where y is the predicted AUC from the plasma concentration at 4 h after the administration, and x is the observed AUC.

Table 10 Predictions of area under the curve (AUC) and oral clearance (CL/F) of each cytochrome P450 substrate from plasma concentration and metabolic ratio in plasma, respectively, at a sampling point of 4 h after oral administration.

Cytochrome P450 substrates	MPE (%)	MAE (%)	RMSE (%)
AUC prediction from plasma concentration			
Caffeine	0.8	6.0	8.8
Losartan	17.5	35.8	49.7
Omeprazole	457.2	484.0	1987.3
Dextromethorphan	17.1	31.7	55.2
Midazolam	26.1	40.3	98.7
CL/F prediction from metabolic ratio			
Caffeine	54.4	75.8	130.9
Losartan	22.3	44.8	59.2
Omeprazole	49.1	157.6	224.7
Dextromethorphan	113.9	140.9	252.8
Midazolam	4342.0	4363.7	6437.0

MPE: mean prediction error, MAE: mean absolute error, RMSE: root mean squared error.

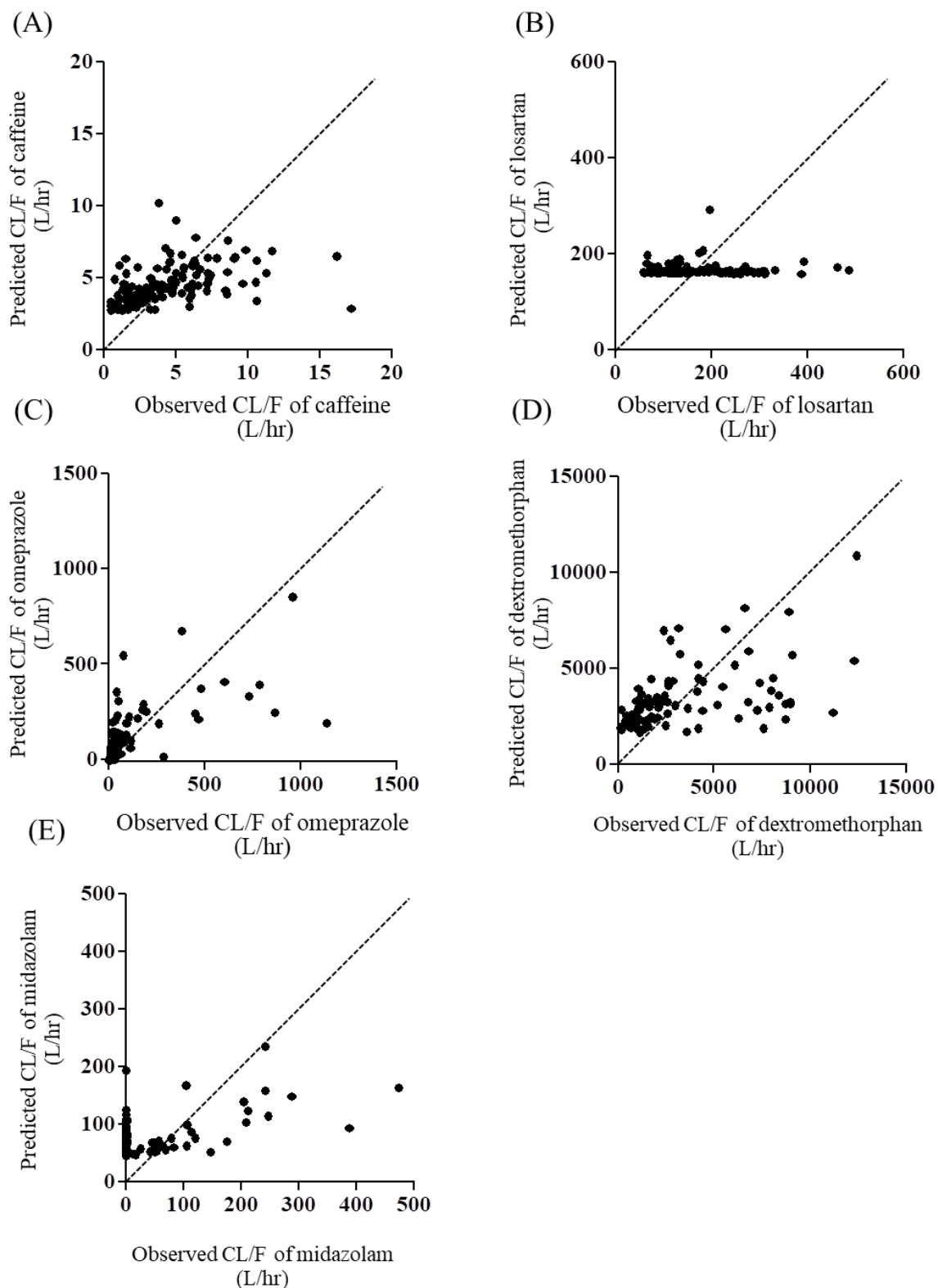


Fig. 27 The relationship between observed oral clearance (CL/F) and predicted CL/F from the metabolic ratio in plasma of caffeine (A), losartan (B), omeprazole (C), dextromethorphan (D), and midazolam (E) at 4 h after the administration of the cocktail drug. Each point represents the value for each volunteer. The dashed line shows, $y = x$, where y is the predicted CL/F from the metabolic ratio in plasma at 4 h after the administration, and x is the observed CL/F.

第4節 考察

カクテル試験における各 CYP 基質薬とそれらの代謝物の 1 点採血による血漿中濃度が各基質の AUC 又は CL/F を予測できるかどうかを評価した。CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4 の 5 つの基質薬 (caffeine、losartan、omeprazole、dextromethorphan、midazolam) を用いた本カクテル試験において、カクテル薬投与後 1-8 時間の血漿中濃度と各 AUC の間に有意な正の相関が認められた。各基質薬の血漿中濃度と AUC の関係を調査した結果、caffeine は投与後 4 時間、losartan は投与後 2 時間、omeprazole は投与後 4 時間、dextromethorphan は投与後 6 時間、midazolam は投与後 1.5 時間の決定係数が最も高値となった。また投与後 2-4 時間の両者の決定係数は全ての基質で 0.5 以上であった。過去に報告されている各基質の最高血中濃度到達時間に比べ、各基質薬の決定係数が最大となる時間は遅く、最高血中濃度到達時間以降の採血時間において各血漿中濃度と AUC の決定係数が最大となった^{67,93,114-116}。これらの結果から薬剤吸収のばらつきが安定する時間以降に、各血漿中薬物濃度と AUC の決定係数が高値となる可能性が考えられた。また midazolam の決定係数が最大となる時間は投与後 1.5 時間と最も早かった。これは midazolam の最高血中濃度到達時間が早く、吸収が早いため投与後早期に決定係数が最大となったと考えられる⁶⁷。これに対し、omeprazole は腸溶製剤であり、過去の報告と同様に吸収に時間がかかるため、決定係数が最大となる時間は遅くなったと考えられる^{42,117}。各基質薬の血漿中濃度と AUC の相関関係についても、吸収の早い薬剤は薬剤投与後早期に決定係数が高値となり、吸収の遅い薬剤は投与後、時間が経過してから決定係数が高値となる傾向が認められた。

一方、各基質薬の血漿中濃度代謝比と CL/F の関係では、caffeine は投与後 6 時間、losartan は投与後 0.5 時間、omeprazole は投与後 1 時間、dextromethorphan は投与後 0.5 時間、midazolam は投与後 3 時間の相関関係が最も良好であった。しかしながら血漿中濃度代謝比と CL/F の決定係数は、血漿中濃度と AUC の決定係数より低値を示す傾向が認められた。

全ての基質薬において、同じ採血点 (1 回の採血) で AUC や CL/F を予測する場合、5 つの全ての基質薬の決定係数の平均値が最大となったことから、カクテル薬投与 4 時間後の血漿中濃度を用いて AUC 予測を行う方法が最適であると考えられた。

カクテル薬投与後 4 時間の採血ポイントにおける基質薬の血漿中濃度を用いた AUC 予測と血漿中濃度代謝比を用いた CL/F 予測のバイアス及び精度を評価するためにクロスバリデーション法を用いて MPE、MAE、RMSE を算出した。その結果、caffeine、losartan、dextromethorphan、midazolam 血漿中濃度の AUC 予測バイアス (MPE) と予測精度 (MAE) はそれぞれ 26.1% 及び 40.3% 以下を示した。このようにカクテル薬投与後 4 時間の caffeine、losartan、dextromethorphan、midazolam の血漿中濃度を評価することで CYP 誘導薬又は阻害薬併用時の AUC を予測可能であると考えられた。また血漿中濃度代謝比を用いた CL/F 予測精度は AUC 予測精度と比べ、全体的に低くなる傾向が認められた。加えて、omeprazole の AUC 予測に関する MPE、MAE 及び RMSE は他の CYP 基質と比較して高値を示した。これに対し、Ryu らの報告では Inje cocktail を用いて CYP 誘導薬及び阻害薬非併用時の CYP2C19 活性評価の指標として投与後 4 時間の omeprazole 代謝比が適していると報告している⁴²。本論では CYP 誘導

薬と阻害薬を投与し、評価を行った。Rifampicin は omeprazole の代謝に関連する CYP2C19 と 3A4 誘導を起こすことが知られており、rifampicin の影響により多くの検体で血漿中 omeprazole 濃度が定量限界以下となった^{45,82,89,118}。このため omeprazole の AUC を十分に評価できず、omeprazole の MPE、MAE、RMSE が他の基質より高値となった可能性が考えられた。また CYP2C9 の指標である losartan に関しては CL/F の予測指標である MPE、MAE 及び RMSE は低値であったが、血漿中濃度代謝比と CL/F の相関関係はほぼ認められなかった。Losartan については 1 点採血による評価は困難だと考えられた。実際に losartan を用いた CYP2C9 活性の指標として、losartan 投与後 0 から 8 時間の蓄尿による尿検体を使用されている^{40,42}。Losartan 代謝物である E-3174 の最高血中濃度到達時間は 5–6 時間と他の基質薬代謝物と比べ遅く、生成に時間がかかることが報告されており、1 点採血による血漿中濃度代謝比での CL/F 評価は難しい可能性がある¹¹⁹。Losartan を用いた評価では、これまでの報告のように十分な量の代謝物を集める必要があると考えられた。

本論ではカクテル薬の基質として Inje cocktail を参考にしているため、caffeine、losartan、omeprazole、dextromethorphan、midazolam を用いた。Inje cocktail の基質薬は薬物動態パラメータを評価するために複数回の採血が必要となる組み合わせであり、single-point sampling 法に適した新たなカクテル薬の基質を検討することで、カクテル試験による 1 点採血評価法の精度が向上する可能性がある。

Inje cocktail を含むこれまでに報告されたカクテル試験では single-point sampling 又は limited-point sampling 法が試されてきた^{39,42,43,49,113,120,121}。しかしながら、これらの試験では各基質薬により適した採血時間が異なっていた。さらにこれらの試験の多くは CYP 誘導薬や阻害薬を併用せずに評価を行っていた。近年、Coelho らはカクテル試験のデータをレトロスペクティブに評価し、limited-point sampling 法について検証を行った¹¹³。彼らは、5 つの CYP 基質薬 (caffeine、losartan、omeprazole、metoprolol、midazolam) と 1 つのトランスポーターの基質薬 (fexofenadine) をカクテル薬としてプロポリス製剤と併用した。その結果、limited-point sampling 法として 3 回もの採血 (投与後 90 分、120 分、240 分) が必要だと報告している。本論は rifampicin、cimetidine、又は fluvoxamine を投与し、CYP 誘導又は阻害が生じた場合の各基質薬の血漿中濃度と AUC の関係性を評価した。これは相互作用により CYP 誘導又は阻害が生じた場合でも、single-point sampling で各基質薬の AUC を評価できる可能性があり、CYP1A2、CYP2C9、CYP2D6、CYP3A4 に関連した潜在的な薬物相互作用や CYP 活性を評価するのに有用な方法だと考えられる。

以上の結果から、カクテル薬投与後 4 時間での caffeine、losartan、dextromethorphan、midazolam の血漿中濃度を評価することで、各基質薬の AUC を予測し得ることが示唆された。カクテル試験による複数の CYP 基質薬を用いた臨床薬物動態試験を実施することで一度に複数の CYP 活性を評価することができ、臨床試験回数を減じることができる。第 1 章で述べたように被験者の負担を軽減した臨床試験法は、採血や薬剤投与に制限のある患者、特に高齢者や小児患者、又は腎・肝疾患のある患者においても安全に実施することができる。さらに医薬品開発や各患者に合わせた薬物療法実施のための手法として有用だと考えられる。このため臨床試験の低侵襲化が求められており、その手法として採血回数を減らした方法や基質薬投

与量を減らした方法、採血量を減らした方法など様々な手法が用いられている。本論はカクテル試験における 1 点採血による低侵襲な臨床薬物動態試験の実用化に役立つと考えられ、基質薬投与量を減らした方法、採血量を減らした方法なども組み合わせることで、より被験者の負担を軽減した臨床試験法の確立が期待される。

総括

CYP 活性には個人差があり、様々な要因によりその活性は変動する。さらに CYP を介した薬物相互作用は数多く報告されており、臨床上大きな問題となることがある。通常、CYP 活性や CYP を介した薬物相互作用を評価する場合、単一の CYP 基質薬を用いて基質薬の体内動態の変化を評価することで CYP 活性や薬物相互作用の有無を判定する。しかしながら CYP 基質薬の薬物動態パラメータを算出するためには頻回採血及び長時間の拘束が必要となり、被験者に対する負担が大きい。また現在ではセルフメディケーションにも注目が集まり、医療用医薬品のみではなく、一般用医薬品や健康食品などの相互作用についても注意する必要がある。しかしながら、これらの組み合わせについて一つずつ、それぞれの CYP 分子種に対して試験を行うことは現実的ではない。そこで注目されるのが被験者の負担を軽減するための採血回数を減らした評価法や網羅的に CYP 基質薬の体内動態を評価できるカクテル試験である。

しかしながら、採血回数を減らした評価法は検討されているものの、未だに確立していない。また CYP 誘導薬及び阻害薬併用時のカクテル試験により評価された CYP 活性変動が、CYP 基質薬単独投与による臨床試験で評価された変動と同程度かは不明であり、カクテル試験の妥当性が十分に検証されているとは言えない。さらにカクテル試験を用いた低侵襲な CYP 活性評価法についても報告はわずかである。そこで本論では、まず midazolam を用いた低侵襲な CYP3A4 活性評価法の検討を行い、続いてカクテル試験を用いた薬物相互作用の網羅的解析の妥当性の評価及び 1 点採血による CYP 活性評価法の確立が可能であるか検討した。

第 1 章において、CYP3A4 基質薬である midazolam を用いた 1 点採血又は尿検体による低侵襲な AUC 及び CL 評価が可能であるか検討を行った。本検討では静脈内及び経口投与後、全ての採血ポイントで血漿中 midazolam 濃度は AUC と良好な相関を示した。また両者の決定係数は、全ての採血ポイントにおいて静脈内投与及び経口投与後、それぞれ 1-2 時間及び 2-4 時間で高値を示し、それぞれ $r^2 > 0.96$ 及び $r^2 > 0.94$ であった。また予測バイアスや予測精度は、静脈内投与と経口投与後それぞれ 1.5 時間と 4 時間で最大となった。一方、血漿中濃度代謝比と CL の決定係数は、血漿中濃度と AUC の係数よりも低値であった。したがって、midazolam の AUC は、静脈内投与の 1.5 時間後及び経口投与の 4 時間後の血漿中 midazolam 濃度により評価できることが示唆された。また尿中 midazolam 排泄量を用いた検討では、経口投与のみ midazolam の AUC との間に有意な正の相関が認められた。このため midazolam 尿中排泄量が経口投与後の AUC 予測の指標となり得る可能性が認められた。

第 2 章では CYP 誘導薬及び阻害薬併用におけるカクテル薬投与時と CYP 基質薬 (CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4) 単独投与時との CYP 活性変動の程度を比較検討し、カクテル試験が CYP 基質薬単独投与時と同様に薬物相互作用を定量的に評価可能であるか検討した。CYP 基質薬単独投与試験及びカクテル試験による AUC 変動率の間に強い正の相関が認められた。本論では、初めて CYP 活性変動により生じた薬物相互作用をカクテル試験による評価と CYP 基質薬単独投与試験による評価の両試験の結果を用いて比較検討することで、カクテル試験による定量的な薬物相互作用評価の妥当性について検討を行った。今回、実際に行った CYP

基質薬単独投与試験結果と文献検索より選択した複数文献の結果を使用し、CYP 基質薬単独投与試験の結果としているため、各試験における被験者は様々である。異なる被験者であるにも関わらず、基質薬単独投与試験とカクテル試験の AUC 変動率の間の相関係数は 0.959 と高値が得られた。さらに、CYP 基質薬単独投与の結果とカクテル試験の結果から得られた AUC 変動率比について調査した結果、rifampicin と 3 つの CYP 基質薬 (omeprazole、dextromethorphan、midazolam) の組み合わせを除いて、AUC 変動率比は±50%以内であった。カクテル試験における各 CYP 基質薬の AUC 変動率は、CYP 基質薬単独投与試験の AUC 変動率とほぼ同様であると考えられた。

第 3 章では、CYP 活性評価法の 1 つであるカクテル試験の低侵襲化を目的とし、カクテル試験での 1 点採血における CYP 活性評価法の確立を行うために解析を行った。その結果、カクテル薬投与後 4 時間での各 CYP 基質薬の血漿中薬物濃度は各 AUC と高い相関性があることが認められた。本論は Inje cocktail を用いて CYP 誘導薬及び阻害薬併用時の影響も含めて解析を行っており、CYP 誘導又は阻害が起きた場合でも投与後 4 時間の各基質薬の血漿中濃度を評価することで AUC を評価できると考えられた。またクロスバリデーション法を用いて MPE、MAE 及び RMSE を算出し、予測バイアスと精度を評価した。その結果、caffeine、losartan、dextromethorphan、midazolam 血漿中濃度の AUC 予測バイアス (MPE) と予測精度 (MAE) はそれぞれ 26.1%及び 40.3%以下と算出された。このようにカクテル薬投与後 4 時間の caffeine、losartan、dextromethorphan、midazolam の血漿中濃度を評価することで CYP 誘導薬及び阻害薬の影響も含め AUC を予測できる可能性が示された。

以上の結果から、midazolam の AUC は静脈内投与後 1.5 時間及び経口投与後 4 時間の血漿中 midazolam 濃度を評価することで予測することができ、midazolam 経口投与後の尿中 midazolam 排泄量は AUC 評価の指標となる可能性が認められた。またカクテル試験で、CYP 基質薬の単独投与試験のように、CYP 阻害による AUC 変動率を評価できた。一部の基質薬 (CYP2C19、2D6、3A4) では、rifampicin による CYP 誘導効果についてはさらなる調査が必要であると考えられたが、カクテル試験と単独投与試験の間には有意な相関が認められ、カクテル試験は網羅的で定量的な薬物相互作用評価が可能であることが明らかとなった。さらにカクテル薬投与後 4 時間における caffeine、losartan、dextromethorphan、midazolam の血漿中濃度を評価することで各基質薬の AUC を予測できる可能性が認められた。これらの方法は、網羅的かつ定量的な薬物相互作用評価や CYP 代謝活性の個人差予測に対し応用可能であり、侵襲性が低く、様々な患者の適切な治療決定に有用であるとともに、新薬開発における薬物相互作用スクリーニング法及び CYP 活性評価法として医薬品開発にも役立つことが期待される。

謝辞

終わりに臨み、本研究の遂行にあたり、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜り、また本稿の御校閲を頂き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。

本研究の細部にわたり親身なる御指導と御鞭撻を頂き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、ご指導及びご助言を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院 賀川義之教授、静岡県立大学大学院薬学研究院 近藤啓教授、ならびに静岡県立大学大学院薬学研究院 佐藤秀行准教授に心より感謝致します。

本研究を遂行にあたり多くのご協力を頂きました静岡県立大学大学院薬学研究院 柏倉康治講師、田中紫茉莉助教、ならびに実践薬学講座の学生諸君に感謝の意を表します。

本研究の機会を与えて頂き、御鞭撻を賜りました浜松医科大学医学部附属病院薬剤部長 川上純一教授に心より感謝の意を表します。また本研究に関して、種々の貴重なご助言と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、浜松医科大学臨床薬理学講座 乾直輝准教授、浜松医科大学臨床研究センター 小田切圭一特任准教授に心より御礼申し上げます。

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りました浜松医科大学医学部附属病院薬剤部の方々、ならびに家族に心より感謝致します。

参考文献

- 1) 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**, 875-94 (2006).
- 2) 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).
- 3) Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med.*, **352**, 2211-21 (1993).
- 4) Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.*, **270**, 414-23 (1994).
- 5) Michalets EL. Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy.*, **18**, 84-112 (1998).
- 6) Yasukochi Y, Satta Y. Evolution of the CYP2D gene cluster in humans and four non-human primates. *Genes Genet Syst.*, **86**, 109-16 (2011).
- 7) 千葉 寛: ヒト P450 分子種同定臨床薬理学及び医薬品開発における意義. *薬物動態*, **10**, 391-402 (1995).
- 8) Miriam SR, Susana A, Marcos NG, Dolores O, Manuel R, Pablo Z, Dora K, María S, Gina M, Alberto M B, Cristina RA, Francisco AS. Effect of the Most Relevant CYP3A4 and CYP3A5 Polymorphisms on the Pharmacokinetic Parameters of 10 CYP3A Substrates. *Biomedicines.*, **8**, 94 (2020).
- 9) 医療現場における薬物相互作用へのかかわり方ガイド(<https://www.jsphcs.jp/file/asc1.pdf>) 2020年7月15日引用.
- 10) 横井 毅: 薬物代謝酵素の遺伝的多型と個別薬物療法. *化学と生物*, **39**, 368-375 (2001).
- 11) Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet.*, **41**, 913-58 (2002).
- 12) 加藤隆一: 臨床薬物動態学. p. 173 (2009) (南江堂).
- 13) 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).
- 14) Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet.*, **360**, 1155-62 (2002).
- 15) ワルファリンカリウム及びアゾール系抗真菌剤 (経口剤・注射剤) の「使用上の注意」改訂の周知について (依頼) (平成 28 年 10 月 18 日) (<https://www.pmda.go.jp/files/000214601.pdf>) 2020年7月15日引用.
- 16) Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and

- clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet.*, **38**, 41-57 (2000).
- 17) Williams D, Feely J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet.*, **41**, 343-70 (2002).
 - 18) Neuvonen PJ, Kantola T, Kivistö KT. Simvastatin but not pravastatin is very susceptible to interaction with the CYP3A4 inhibitor itraconazole. *Clin Pharmacol Ther.*, **63**, 332-41 (1998).
 - 19) Desta Z, Kerbusch T, Flockhart DA. Effect of clarithromycin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pimozide in healthy poor and extensive metabolizers of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6). *Clin Pharmacol Ther.*, **65**, 10-20 (1999).
 - 20) 前田 和哉: 胆汁排泄とトランスポーター. *日薬理誌*, **135**, 76-79 (2010).
 - 21) 村山 純一郎: 臨床における薬物間相互作用. *昭和医会誌*, **60**, 2-10 (2000).
 - 22) Taro K, Masahiro A, Yumi K, Kiyoshi Y, Hiroshi Y, Masato E, Yasuyoshi O. High Risk of Adverse Drug Reactions in Elderly Patients Taking Six or More Drugs: Analysis of Inpatient Database. *Geriatr Gerontol Int.*, **12**, 761-2 (2012).
 - 23) 厚生労働省: 薬事法及び薬剤師法の一部を改正する法律 (平成 25 年法律第 103 号) (https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/gaiyou_1.pdf) 2020 年 7 月 15 日引用.
 - 24) 厚生労働省: 販売制度 (ルール) の改正 (平成 26 年 6 月 12 日施行) (<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/sinseido.pdf>) 2020 年 7 月 15 日引用.
 - 25) 都民を対象とした「健康食品」の摂取に係る調査結果報告書 (平成 28 年 2 月) (http://www.tokyo-eiken.go.jp/files/top/27_kenshoku_houkokusho.pdf) 2020 年 7 月 15 日引用.
 - 26) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) (2017). Clinical Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, and Clinical Implications Guidance for Industry. (<https://www.fda.gov/media/82734/download>) 2020 年 7 月 15 日引用.
 - 27) European Medicines Agency (2015). Guideline on the investigation of drug interactions. (https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions-revision-1_en.pdf.) 2020 年 7 月 15 日引用.
 - 28) 厚生労働省: 「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」 (平成 30 年 7 月 23 日) (<https://www.pmda.go.jp/files/000225191.pdf>) 2020 年 7 月 15 日引用.
 - 29) Arnold YE, Thorens J, Bernard S, Kalia YN. Drug Transport across Porcine Intestine Using an Ussing Chamber System: Regional Differences and the Effect of P-Glycoprotein and CYP3A4 Activity on Drug Absorption. *Pharmaceutics.*, **11**, 139 (2019).
 - 30) Tahara H, Watanabe M, Hasegawa M. A comparative study for detecting CYP3A induction by CYP3A probe drugs and endogenous markers in cynomolgus monkeys. *Biopharm Drug Dispos.*, **40**, 81-93 (2019).
 - 31) Derayea SM, Tsujino H, Oyama Y, Ishikawa Y, Yamashita T, Uno T. Investigation on drug-binding in heme pocket of CYP2C19 with UV-visible and resonance Raman

- spectroscopies. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, **209**, 209-216 (2019).
- 32) Moscovitz JE, Lin Z, Johnson N, Tu M, Goosen TC, Weng Y, Kalgutkar AS. Induction of human cytochrome P450 3A4 by the irreversible myeloperoxidase inactivator PF-06282999 is mediated by the pregnane X receptor. *Xenobiotica.*, **48**, 647-655 (2018).
 - 33) 齋尾 武郎、栗原千絵子: 動物実験のヒトへの外挿可能性について. *Clin Eval.*, **38**, 385-392 (2010)
 - 34) 樋坂章博: 臨床薬物相互作用のシミュレーションによる予測. *ファルマシア*, **50**, 664-668 (2014),
 - 35) 大石昌代: 医薬品研究開発における Modeling and Simulation (M&S) 手法の紹介. *薬剤学*, **78**, 175-180 (2018)
 - 36) Morcos PN, Cleary Y, Guerini E, Dall G, Bogman K, Petris LD, Viteri S, Bordogna W, Yu L, Martin-Facklam M, Phipps A. Clinical Drug-Drug Interactions Through Cytochrome P450 3A (CYP3A) for the Selective ALK Inhibitor Alectinib. *Clin Pharmacol Drug Dev.*, **6**, 280-291 (2017).
 - 37) Kusawake T, den Adel M, Groenendaal-van de Meent D, et al. Pharmacokinetic Evaluation of the Interactions of Amenamevir (ASP2151) with Ketoconazole, Rifampicin, Midazolam, and Warfarin in Healthy Adults. *Adv Ther.*, **34**, 2466-2480 (2017).
 - 38) Ouwerkerk-Mahadevan S, Snoeys J, Peeters M, Beumont-Mauviel M, Simion A. Drug-Drug Interactions with the NS3/4A Protease Inhibitor Simeprevir. *Clin Pharmacokinet.*, **55**, 197-208 (2016).
 - 39) 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**, 375-83 (2000).
 - 40) 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**, 517-28 (2003).
 - 41) Chainuvati S, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A, Kearns GL, Sellers E, Zhang Y, Kashuba ADM, Rowland E, Bertino JS Jr. Combined phenotypic assessment of cytochrome p450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the "Cooperstown 5+1 cocktail". *Clin Pharmacol Ther.*, **74**, 437-47 (2003).
 - 42) 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**, 531-40 (2007).
 - 43) Donzelli M, Derungs A, Serratore M-G, Noppen C, Nezić L, Krähenbühl S, Haschke M. The Basel Cocktail for Simultaneous Phenotyping of Human Cytochrome P450 Isoforms in Plasma, Saliva and Dried Blood Spots. *Clin Pharmacokinet.*, **53**, 271-282 (2014).
 - 44) Turpault S, Brian W, Van Horn R, Santoni A, Poitiers F, Donazzolo Y, Boulenc X.

- Pharmacokinetic assessment of a five-probe cocktail for CYPs 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A. *Br J Clin Pharmacol.*, **68**, 928-35 (2009).
- 45) Inui N, Akamatsu T, Uchida S, Tanaka S, Namiki N, Karayama M, Chida K, Watanabe H. Chronological effects of rifampicin discontinuation on cytochrome P450 activity in healthy Japanese volunteers, using the cocktail method. *Clin Pharmacol Ther.*, **94**, 702-8 (2013).
 - 46) Wang X, Zhang ZY, Arora S, Wang J, Lu S, Powers D, Kansra V. Effects of Rolapitant Administered Intravenously on the Pharmacokinetics of a Modified Cooperstown Cocktail (Midazolam, Omeprazole, Warfarin, Caffeine, and Dextromethorphan) in Healthy Subjects. *J Clin Pharmacol.*, **58**, 1074-1083 (2018).
 - 47) Frye RF, Matzke GR, Adedoyin A, Porter JA, Branch RA. Validation of the five-drug "Pittsburgh cocktail" approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes. *Clin Pharmacol Ther.*, **62**, 365-76 (1997).
 - 48) Masters JC, Harano DM, Greenberg HE, Tsunoda SM, Jang IJ, Ma JD. Limited sampling strategy of partial area under the concentration-time curves to estimate midazolam systemic clearance for cytochrome P450 3A phenotyping. *Ther Drug Monit.*, **37**, 84-9 (2015).
 - 49) Derungs A, Donzelli M, Berger B, Noppen C, Krähenbühl S, Haschke M. Effects of Cytochrome P450 Inhibition and Induction on the Phenotyping Metrics of the Basel Cocktail: A Randomized Crossover Study. *Clin Pharmacokinet.*, **55**, 79-91 (2016).
 - 50) Kim JS, Nafziger AN, Tsunoda SM, Choo EE, Streetman DS, Kashuba AD, Kulawy RW, Beck DJ, Rocci ML Jr, Wilkinson GR, Greenblatt DJ, Bertino JS Jr. Limited sampling strategy to predict AUC of the CYP3A phenotyping probe midazolam in adults: application to various assay techniques. *J Clin Pharmacol.*, **42**, 376-82 (2002).
 - 51) Chaobal HN, Kharasch ED. Single-point sampling for assessment of constitutive, induced, and inhibited cytochrome P450 3A activity with alfentanil or midazolam. *Clin Pharmacol Ther.*, **78**, 529-39 (2005).
 - 52) Lin YS, Lockwood GF, Graham MA, Brian WR, Loi CM, Dobrinska MR, Shen DD, Watkins PB, Wilkinson GR, Kharasch ED, Thummel KE. *In-vivo* phenotyping for CYP3A by a single-point determination of midazolam plasma concentration. *Pharmacogenetics.*, **11**, 781-91 (2001).
 - 53) Rogers JF, Nafziger AN, Kashuba AD, Streetman DS, Rocci ML Jr, Choo EF, Wilkinson GR, Bertino JS Jr. Single plasma concentrations of 1'-hydroxymidazolam or the ratio of 1'-hydroxymidazolam: midazolam do not predict midazolam clearance in healthy subjects. *J Clin Pharmacol.*, **42**, 1079-82 (2002).
 - 54) Streetman DS, Kashuba AD, Bertino JS Jr, Kulawy R, Rocci ML Jr, Nafziger AN. Use of midazolam urinary metabolic ratios for cytochrome P450 3A (CYP3A) phenotyping. *Pharmacogenetics.*, **11**, 349-55 (2001).
 - 55) de Andrés F, Terán S, Bovera M, Fariñas H, Terán E, LLerena A. Multiplex Phenotyping for Systems Medicine: A One-Point Optimized Practical Sampling Strategy for Simultaneous

- Estimation of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 Activities Using a Cocktail Approach. *OMICS.*, **20**, 88-96 (2016).
- 56) Wilkinson GR. Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of *in vivo* activity in humans. *J Pharmacokinet Biopharm.*, **24**, 475-90 (1996).
 - 57) Wachter VJ, Silverman JA, Zhang Y, Benet LZ. Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. *J Pharm Sci.*, **87**, 1322-30 (1998).
 - 58) Schwartz JB. The influence of sex on pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.*, **42**, 107-21 (2003).
 - 59) Rodighiero V. Effects of liver disease on pharmacokinetics. An update. *Clin Pharmacokinet.*, **37**, 399-431 (1999).
 - 60) Gorski JC, Hall SD, Jones DR, VandenBranden M, Wrighton SA. Regioselective biotransformation of midazolam by members of the human cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol.*, **47**, 1643-53 (1994).
 - 61) Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Hartwell PS, Raisys VA, Marsh CL, McVicar JP, Barr DM, Perkins JD, Carithers RL Jr. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. *In vitro-in vivo* correlations in liver transplant patients. *J Pharmacol Exp Ther.*, **271**, 549-56 (1994).
 - 62) ドルミカム注射液 10mg インタビューフォーム 2019 年 7 改訂 (第 2 版)
(https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/2/730119_1124401A1052_2_002_1F.pdf) 2020 年 7 月 15 日引用.
 - 63) Krecic-Shepard ME, Barnas CR, Slimko J, Gorski JC, Wainer IW, Schwartz JB. *In vivo* comparison of putative probes of CYP3A4/5 activity: erythromycin, dextromethorphan, and verapamil. *Clin Pharmacol Ther.*, **66**, 40-50 (1999).
 - 64) Lee JI, Chaves-Gnecco D, Amico JA, Kroboth PD, Wilson JW, Frye RF. Application of semisimultaneous midazolam administration for hepatic and intestinal cytochrome P450 3A phenotyping. *Clin Pharmacol Ther.*, **72**, 718-28 (2002).
 - 65) Gorski JC, Jones DR, Haehner-Daniels BD, Hamman MA, O'Mara EM Jr, Hall SD. The contribution of intestinal and hepatic CYP3A to the interaction between midazolam and clarithromycin. *Clin Pharmacol Ther.*, **64**, 133-43 (1998).
 - 66) Schmiedlin-Ren P, Thummel KE, Fisher JM, Paine MF, Lown KS, Watkins PB. Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃. *Mol Pharmacol.*, **51**, 741-54 (1997).
 - 67) 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**, 290-5 (2010).
 - 68) Yan D, Yang Y, Uchida S, Misaka S, Luo J, Takeuchi K, Inui N, Yamada S, Ohashi K, Watanabe H. Effects of ursodeoxycholic acid on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of

- intravenous and oral midazolam in healthy volunteers. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, **377**, 629-36 (2008).
- 69) Sheiner LB, Beal SL. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokinet Biopharm.*, **9**, 503-12(1981).
- 70) Lee LS, Bertino JS Jr, Nafziger AN. Limited sampling models for oral midazolam: midazolam plasma concentrations, not the ratio of 1-hydroxymidazolam to midazolam plasma concentrations, accurately predicts AUC as a biomarker of CYP3A activity. *J Clin Pharmacol.*, **46**, 229-34 (2006).
- 71) Tai W, Gong SL, Tsunoda SM, Greenberg HE, Gorski JC, Penzak SR, Stoch SA, Ma JD. Evaluation of partial area under the concentration time curve to estimate midazolam apparent oral clearance for cytochrome P450 3A phenotyping. *Drug Metabol Drug Interact.*, **28**, 217-23 (2013).
- 72) Veronese ML, Gillen LP, Burke JP, Dorval EP, Hauck WW, Pequignot Ed, Waldman SA, Greenberg HE. Exposure-dependent inhibition of intestinal and hepatic CYP3A4 *in vivo* by grapefruit juice. *J Clin Pharmacol.*, **43**, 831-9 (2003)
- 73) Mueller SC, Drewelow B. Evaluation of limited sampling models for prediction of oral midazolam AUC for CYP3A phenotyping and drug interaction studies. *Eur J Clin Pharmacol.*, **69**, 1127-34 (2013).
- 74) Lammers LA, Achterbergh R, Pistorius MC, et al Bijleveld Y, de Vries EM, Boelen A, Klümper HJ, Romijn JA, A Mathôt RA. Quantitative Method for Simultaneous Analysis of a 5-Probe Cocktail for Cytochrome P450 Enzymes. *Ther Drug Monit.*, **38**, 761-768 (2016)
- 75) Alekseenko SA, Timoshin SS. The effect of histamine H2 receptor blockers on reparative processes in the gastric mucosa of patients with gastric peptic ulcer. *Ter Arkh.*, **71**, 23-6 (1999).
- 76) タガメット錠インタビューフォーム, 2020年5月改訂 (第6版)
(https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/4/400093_2325001C1053_4_006_1F.pdf) 2020年7月15日引用.
- 77) Böhmer GM, Gleiter CH, Mörike K, Nassr N, Walz A, Lahu G. No dose adjustment on coadministration of the PDE4 inhibitor roflumilast with a weak CYP3A, CYP1A2, and CYP2C19 inhibitor: an investigation using cimetidine. *J Clin Pharmacol.*, **51**, 594-602 (2011).
- 78) Madeira M, Levine M, Chang TK, Mirfazaelian A, Bellward GD. The effect of cimetidine on dextromethorphan O-demethylase activity of human liver microsomes and recombinant CYP2D6. *Drug Metab Dispos.*, **32**, 460-7 (2004).
- 79) 千葉寛: 代謝に関与する酵素 (CYP450 等) の分子種. 医学のあゆみ, **182**, 803-806 (1997).
- 80) デプロメール錠インタビューフォーム, 2019年12月改訂 (第28版)
(https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/780009_1179039F1028_1_1F.pdf) 2020年7月15日引用.
- 81) 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**, 603-62 (2003).
- 82) 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**, 275-87 (2003).
- 83) リファジンカプセルインタビューフォーム, 2019年2月改訂 (第15版)
(https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/430574_6164001M1216_1_R15_1F.pdf) 2020年7月15日引用.
- 84) Guengerich FP Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **39**, 1-17 (1999).
- 85) Fromm MF, Busse D, Kroemer HK, Eichelbaum M. Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampin. *Hepatology.*, **24**, 796-801 (1996).
- 86) Backman JT, Kivistö KT, Olkkola KT, Neuvonen PJ. 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).
- 87) Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ, Kivistö KT. Pharmacokinetic interactions with rifampicin : clinical relevance. *Clin Pharmacokinet.*, **42**, 819-50 (2003).
- 88) Tanaka S, Uchida S, Inui N, Takeuchi K, Watanabe H, Namiki N. Simultaneous LC-MS/MS analysis of the plasma concentrations of a cocktail of 5 cytochrome P450 substrate drugs and their metabolites. *Biol Pharm Bull.*, **37**, 18-25 (2014).
- 89) Kamiya C, Inui N, Hakamata A, et al. Effect of co-administered inducer or inhibitor on omeprazole pharmacokinetics based on CYP2C19 genotype. *J Pharmacol Sci.*, **139**, 361-366 (2019).
- 90) May DC, Jarboe CH, VanBakel AB, Williams WM. Effects of cimetidine on caffeine disposition in smokers and nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther.*, **31**, 656-61 (1982).
- 91) Williamson KM, Patterson JH, McQueen RH, Adams KF Jr, Pieper JA. Effects of erythromycin or rifampin on losartan pharmacokinetics in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.*, **63**, 316-23 (1998).
- 92) Goldberg MR, Lo MW, Bradstreet TE, Ritter MA, Höglund P. Effects of cimetidine on pharmacokinetics and pharmacodynamics of losartan, an AT1-selective non-peptide angiotensin II receptor antagonist. *Eur J Clin Pharmacol.*, **49**, 115-9 (1995).
- 93) Yasui-Furukori N, Takahata T, Nakagami T, Yoshiya G, Inoue Y, Kaneko S, Tateishi T. Different inhibitory effect of fluvoxamine on omeprazole metabolism between CYP2C19 genotypes. *Br J Clin Pharmacol.*, **57**, 487-94 (2004).
- 94) Kasichayanula S, Boulton DW, Luo WL, Rodrigues AD, Yang Z, Goodenough A, Lee M, Jemal M, LaCreta F. Validation of 4 β -hydroxycholesterol and evaluation of other endogenous

- biomarkers for the assessment of CYP3A activity in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.*, **78**, 1122-34 (2014).
- 95) Dooley KE, Bliven-Sizemore EE, Weiner M, Lu Y, Nuernberger EL, Hubbard WC, Fuchs EJ, Melia MT, Burman WJ, Dorman SE. Safety and pharmacokinetics of escalating daily doses of the antituberculosis drug rifapentine in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.*, **91**, 881-8 (2012).
 - 96) Backman JT, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Rifampin drastically reduces plasma concentrations and effects of oral midazolam. *Clin Pharmacol Ther.*, **59**, 7-13 (1996).
 - 97) Chung E, Nafziger AN, Kazierad DJ, Bertino JS Jr. Comparison of midazolam and simvastatin as cytochrome P450 3A probes. *Clin Pharmacol Ther.*, **79**, 350-61 (2006).
 - 98) Link B, Haschke M, Grignaschi N, Bodmer M, Aschmann YZ, Wenk M, Krähenbühl S. Pharmacokinetics of intravenous and oral midazolam in plasma and saliva in humans: usefulness of saliva as matrix for CYP3A phenotyping. *Br J Clin Pharmacol.*, **66**, 473-84 (2008).
 - 99) Greenblatt DJ, Locniskar A, Scavone JM, Blyden GT, Ochs HR, Harmatz JS, Shader RI. Absence of interaction of cimetidine and ranitidine with intravenous and oral midazolam. *Anesth Analg.*, **65**, 176-80 (1986).
 - 100) Fee JP, Collier PS, Howard PJ, Dundee JW. Cimetidine and ranitidine increase midazolam bioavailability. *Clin Pharmacol Ther.*, **41**:80-4 (1987).
 - 101) Elliott P, Dundee JW, Elwood RJ, Collier PS. The influence of H₂ receptor antagonists on the plasma concentrations of midazolam and temazepam. *Eur J Anaesthesiol.*, **1**, 245-51 (1984).
 - 102) Martínez C, Albet C, Agúndez JA, Herrero E, Carrillo JA, Márquez M, Benítez J, Ortiz JA. Comparative *in vitro* and *in vivo* inhibition of cytochrome P450 CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A by H₂-receptor antagonists. *Clin Pharmacol Ther.*, **65**, 369-76 (1999).
 - 103) Salonen M, Aantaa E, Aaltonen L, Kanto J. Importance of the interaction of midazolam and cimetidine. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh.)*, **58**, 91-5 (1986).
 - 104) Lam YW, Alfaro CL, Ereshefsky L, Miller M. Pharmacokinetic and pharmacodynamics interactions of oral midazolam with ketoconazole, fluoxetine, fluvoxamine, and nefazodone. *J Clin Pharmacol.*, **43**, 1274-82 (2003).
 - 105) van Dyk M, Marshall JC, Sorich MJ, Wood LS, Rowland A. Assessment of inter-racial variability in CYP3A4 activity and inducibility among healthy adult males of Caucasian and South Asian ancestries. *Eur J Clin Pharmacol.*, **74**, 913-920 (2018).
 - 106) Luo HR, Poland RE, Lin KM, Wan YJ. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C19 in Mexican Americans: a cross-ethnic comparative study. *Clin Pharmacol Ther.*, **80**, 33-40 (2006).
 - 107) Britz H, Hanke N, Volz AK, Spigset O, Schwab M, Eissing T, Wendl T, Frechen S, Lehr T. Physiologically-Based Pharmacokinetic Models for CYP1A2 Drug-Drug Interaction Prediction: A Modeling Network of Fluvoxamine, Theophylline, Caffeine, Rifampicin, and Midazolam. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.*, **8**, 296-307 (2019).

- 108) Nakamura K, Goto F, Ray WA, McAllister CB, Jacqz E, Wilkinson GR, Branch RA. Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquin and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Clin Pharmacol Ther.*, **38**, 402-8 (1985).
- 109) Jurima M, Inaba T, Kadar D, Kalow W. Genetic polymorphism of mephenytoin p(4')-hydroxylation: difference between Orientals and Caucasians. *Br J Clin Pharmacol.*, **19**, 483-7 (1985).
- 110) Stockis A, Watanabe S, Scheen AJ, Tytgat D, Gerin B, Rosa M, Chanteux H, Nicolas JM. Effect of Rifampin on the Disposition of Brivaracetam in Human Subjects: Further Insights into Brivaracetam Hydrolysis. *Drug Metab Dispos.*, **44**, 792-9 (2016).
- 111) Berger B, Bachmann F, Duthaler U, Krähenbühl S, Haschke M. Cytochrome P450 Enzymes Involved in Metoprolol Metabolism and Use of Metoprolol as a CYP2D6 Phenotyping Probe Drug. *Front Pharmacol.*, **9**, 774 (2018)
- 112) Jones DR, Gorski JC, Haehner BD, O'Mara EM Jr, Hall SD. Determination of cytochrome P450 3A4/5 activity *in vivo* with dextromethorphan N-demethylation. *Clin Pharmacol Ther.*, **60**, 374-84 (1996).
- 113) Coelho EB, Cusinato DAC, Ximenez JP, Lanchote VL, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. Limited Sampling Modeling for Estimation of Phenotypic Metrics for CYP Enzymes and the ABCB1 Transporter Using a Cocktail Approach. *Front Pharmacol.*, **11**, 22 (2020).
- 114) Blanchard J, Sawers SJA. The absolute bioavailability of caffeine in man. *Eur J Clin Pharmacol.*, **24**, 93-8 (1983)
- 115) ニューロタン錠インタビューフォーム, 2018年8月改訂 (第19版)
(https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/2/170050_2149039F1031_2_019_1F.pdf) 2020年7月15日引用.
- 116) メジコン錠インタビューフォーム, 2019年12月改訂 (第14版)
(https://www.info.pmda.go.jp/go/interview/2/343018_2223001B1210_2_014_1F.pdf) 2020年7月15日引用.
- 117) Wang J, Wang Y, Fawcett JP, Wang Y, Gu J. Determination of omeprazole in human plasma by liquid chromatography-electrospray quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39**, 631-635 (2005).
- 118) Nazir S, Iqbal Z, Ahmad L, Shah Y, Nasir F. Pharmacokinetics of Omeprazole and Its Metabolites in Three Phases of Menstrual Cycle. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.*, **40**, 13-22 (2015).
- 119) Ronit Z, Stefan S, Marina G, Batya A, Victor D, Yehoshua W, Ahuva G, Erez S. Effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of losartan and its active metabolite E3174 in healthy volunteers. *Ther Drug Monit.*, **23**, 369-73 (2001).
- 120) Zhu B, Ou-Yang DS, Chen XP, Huang SL, Tan ZR, He N, Zhou HH. Assessment of Cytochrome P450 Activity by a Five-Drug Cocktail Approach. *Clin Pharmacol Ther.*, **70**, 455-61 (2001).

- 121) Bosilkovska M, Samer CF, Déglon J, Rebsamen M, Staub C, Dayer P, Walder B, Desmeules JA, Daali Y. Geneva cocktail for cytochrome p450 and P-glycoprotein activity assessment using dried blood spots. *Clin Pharmacol Ther.* **96**, 349-59 (2014).