

ヒトでの Alprazolam 代謝の *in vitro/in vivo* スケーリング における諸要因の解析

平成6年度進学 廣田 徳子
指導教官 杉山 雄一

チトクローム P450 (CYP)は、薬物代謝において最も重要な酵素である。これまで、当研究室では、種々の CYP isozyme の代謝反応に関して、肝ミクロソーム (肝 MS) ならびにヒト CYP 発現系等を用いた *in vitro* 試験から、*in vivo* への定量的なスケール・アップについての研究が行われてきた^{1), 2)}。現在使用されている医薬品については、CYP3A4 により代謝される薬物が最も多いことから、本研究では、CYP3A4 の代表的基質である Alprazolam (ALP) をモデル化合物として選択して、*in vitro/in vivo* スケーリングにおいて問題となる以下の諸要因の解析を行った。

(1) 主代謝経路である 4 位および α 位水酸化における CYP3A4 および CYP3A5 の寄与を考慮して、ヒト CYP 発現系から肝 MS へ、さらに *in vitro* から *in vivo* へのスケール・アップを定量的に行った。P450 代謝の電子伝達系において電子供与に関与する Cytochrome b5 の影響についても検討した。(2) 臨床において CYP3A4 を阻害する Ketoconazole (KET) あるいは Cimetidine (CIM) を併用すると、ALP の AUC は非併用時の 2~3 倍に上昇することが報告されている。そこで、これらの薬物間相互作用に関して、*in vitro* 代謝試験から AUC 上昇率 (Rc) の定量的予測を行った。

(3) CYP3A4 は肝臓だけでなく小腸にも存在することから、*in vivo* 肝代謝能を定量的に予測する際、小腸での初回通過代謝が問題となる。ラットの *in vivo* 試験において肝アベイラビリティ (FH) と吸収率と消化管アベイラビリティ (Fa · Fg) を分離評価し、さらにラットおよびヒトの小腸と肝 MS を用いた *in vitro* 代謝試験を行うことにより、ALP の小腸での代謝の寄与を評価した。

1. CYP 発現系から肝 MS へのスケール・アップ、*in vitro* から *in vivo* へのスケール・アップ

[方法]

in vitro 代謝試験 : ALP を 10 種類のヒト肝 MS あるいは CYP 発現系 (リンバ芽球様細胞系 CYP3A4 および Baculovirus CYP3A4 および CYP3A5) と NADPH 生成系存在下で 37°C、20 分間 incubation した。Ether および 1M Borate Buffer の添加により反応を停止させた後、4 位、 α 位水酸化体および親化合物を HPLC により定量した。発現系を用いた試験においては、種々の濃度の Cyt b5 を添加した場合の ALP 代謝への影響についても検討した。

in vitro 固有クリアランス (CLint) の算出 : 代謝初速度を Michaelis-Menten 式に fitting することにより、Vmax ならびに Km を算出し、その比から CLint を算出した。CYP3A4 および CYP3A5 発現系の代謝試験で得られた CLint と各肝 MS の CYP 含量を用いて、式 (1) により個々の肝 MS における mg タンパク当たりの CLint を予測し、予測値と実測値があうように非線形最小二乗法により、4 位と α 位水酸化に共通な α 、 β を求めた。

予測 CLint = CLint(CYP3A4) · α · CYP3A4 含量 + CLint(CYP3A5) · β · CYP3A5 含量 · · (1)
in vivo へのスケール・アップにおいては、52.5mg MS protein/g liver という換算係数を用いて、CLint を 1 g 肝臓あたりの値に換算した。

in vivo 固有クリアランス (CL_{int, in vivo}) の算出: 文献情報に基づいて得られたヒトにおける体内動態パラメータから、dispersion model に基づいて肝固有クリアランスを算出した。

【結果および考察】

ヒト肝 MS における ALP の 4 位および α 位水酸化代謝は、ともに CYP3A 抗体により顕著に阻害されたことから、両代謝経路にはおもに CYP3A が関与することが示唆された。

各々のヒト肝 MS における CL_{int} と CYP3A4 および CYP3A5 含量との相関関係を見ると、4 位水酸化の場合 CYP3A4 含量と、α 位水酸化の場合 CYP3A5 含量との相関が良く、α 位水酸化には CYP3A5 の寄与が大きいことが示唆された (Fig.1)。発現系の代謝試験における V_{max} は、4 位水酸化の場合、CYP3A4 発現系が CYP3A5 発現系の約 4 倍、逆に α 位水酸化の場合、CYP3A5 発現系が CYP3A4 発現系の約 3 倍であった。CYP 発現系に Cyt b5 を添加した試験では、代謝速度は 4 位および α 位水酸化ともに添加濃度依存的に増大し、最大で 3~4 倍に達した。ヒト肝 MS の CL_{int} と比較して、発現系の CL_{int} は、式 (1) で α、β を 1 とすると、代謝速度が最大となる濃度の Cyt b5 を添加した場合、

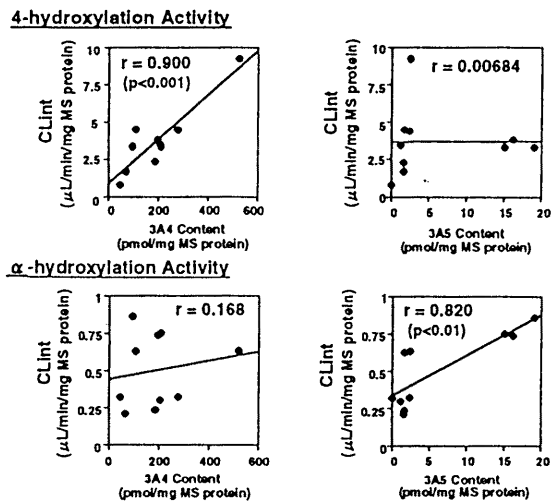


Fig.1 Correlation between Alprazolam 4- and α-hydroxylation Activities and CYP3A4, CYP3A5 Content of Human Liver Microsomes

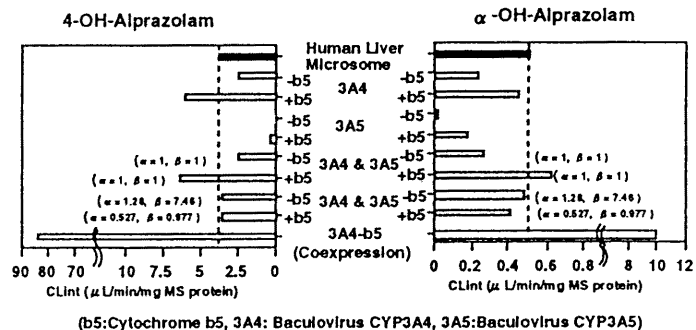


Fig.2 Comparison of Alprazolam Intrinsic Clearance by Human Liver Microsomes and Recombinant P450

過大評価した値が、添加しない場合、過小評価した値が得られた。一方、得られた α、β で補正した場合、肝 MS と非常に近い CL_{int} 値が得られた (Fig.2)。CL_{int, in vivo} と比較すると、ヒト肝 MS と発現系 CYP3A4 と CYP3A5 から求めた CL_{int} は、その 2.5 倍以内と近い値が得られた。Cyt b5 と CYP3A4 の共発現系に関しては、大きく過大評価され、高い代謝能が得られても *in vivo* 肝代謝能の定量的予測には向かないことが示唆された。このことにより、ALP 代謝に関して発現系から肝 MS へ、*in vitro* から *in vivo* へのスケール・アップが定量的に行えることが示唆された。

2. ALP に関する CYP3A4 の関与する *in vivo* 薬物間相互作用の *in vitro* 試験からの予測

【方法】

平均的な CYP3A4 含量を持ち CYP3A5 含量が少ない 2 種類の肝 MS を用いた *in vitro* 代謝阻害試験を行い、K_i 値を算出した。K_i 値および、ALP、KET、CIM の体内動態に関する文献情報から、R_c 値を算出した。阻害剤の濃度 (I_u) は、相互作用を過小評価しないように、経口投与時の肝入り口の非結合型濃度を用いた。CIM については、当研究室でラット遊離肝細胞を用いて得

られた能動輸送に関するパラメータを用い、肝臓への濃縮率を算出した。

【結果および考察】

代謝阻害形式は、KET、CIM とも、4 位水酸化の場合競合、 α 位水酸化の場合非競合阻害であった。KET の K_i 値は、両代謝経路で $0.04\sim 0.08\ \mu\text{M}$ 、CIM の K_i 値は、4 位水酸化で約 $100\ \mu\text{M}$ 、 α 位水酸化で $200\sim 300\ \mu\text{M}$ であった。KET の R_c は 2.30、2.45、*in vivo* の AUC 上昇率は 3.19 であり、良好な予測性が示された。一方、CIM は、経口投与時の体内動態パラメータより求めた l_u は $37.3\ \mu\text{M}$ で、肝臓への濃縮率は 3.92 となり、 R_c は 1.79、1.73 であった（能動輸送を考慮しない場合、1.24、1.22）。*in vivo* の AUC 上昇率は 1.64、1.58 であり、能動輸送を考慮した R_c はこの値に近づくことが示唆された。このことより、ALP に関して、薬物間相互作用についてもヒト肝 MS を用いることにより *in vitro* から *in vivo* への定量的予測が可能であることが示唆された。

3. Alprazolam の小腸での初回通過代謝の評価

【方法】

ラット *in vivo* 試験: 5 と 10mg/kg 静脈内瞬時投与を行い、循環血中および尿中の ALP を HPLC により定量した。 R_b 値を測定し、肝血流量の文献値を用いて F_H を算出した。一方、 12.6mg/kg の十二指腸内投与を行い、循環血と門脈血との AUC の差により $F_a \cdot F_g$ を算出した。

ラットおよびヒト *in vitro* 試験: ラットおよびヒト同一ドナーの小腸および肝 MS について、1. と同様の条件で ALP の代謝試験を行った。

【結果および考察】

ラット静脈内瞬時投与時の全身クリアランスは $25\sim 26\text{mL/min/kg}$ で、尿中に未変化体はほとんど排泄されず、 F_H は約 0.6 と算出された。一方、 $F_a \cdot F_g$ は約 0.9 と非常に高く、ラットにおいて小腸での代謝の寄与が小さいことが示唆された。ラット肝および小腸 MS 代謝試験においても、 CL_{int} は $30\sim 50$ 倍肝の方が大きく、これは、*in vivo* の結果と一致した。ヒトにおいては、4 位水酸化の CL_{int} は肝は小腸の 7 倍、 α 位水酸化については肝と小腸でほぼ同じ値だった。4 位水酸化の寄与は α 位水酸化より大きいため、両代謝経路の合計を比較すると、肝は小腸の約 4 倍と大きな値を示した。このことにより、ヒトにおいても、ALP の代謝において小腸での代謝の寄与が比較的小さいことが明らかとなった。

4. まとめ

ヒト肝 MS から得られた ALP の CL_{int} は、発現系 CYP3A4 および CYP3A5 を用いて得られた CL_{int} と比較的良く一致し、文献情報より算出した $CL_{int, in vivo}$ の 2.5 倍以内であった。このことにより、発現系からヒト肝 MS、肝 MS から *in vivo* 肝クリアランスの定量的予測が可能であることが示唆された。また、KET ならびに CIM との薬物間相互作用において、ヒト肝 MS を用いた代謝阻害試験を行い、*in vivo* の ALP の AUC 上昇率を予測することが可能であった。小腸初回通過代謝については、ラットの *in vivo* 十二指腸内投与試験および小腸ならびに肝 MS を用いた *in vitro* 代謝試験より、ALP の小腸での代謝の寄与は無視できることが示唆された。また、ヒト同一ドナーの小腸および肝 MS の代謝試験においても、小腸代謝の寄与が比較的小さいことが明らかとなった。

【引用文献】 1) Iwatsubo, T., Hirota, N., Ooie, T., Suzuki, H., Shimada, N., Chiba, K., Ishizaki, T., Green, C.E., Tyson, C.A. and Sugiyama, Y. Prediction of *in vivo* drug metabolism in the human liver from *in vitro* metabolism data. *Pharmacol. Ther.* **73**, 147-171, 1997. 2) Iwatsubo, T., Hirota, N., Ooie, T., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. Prediction of *in vivo* drug disposition from *in vitro* data based on physiological pharmacokinetics. *Biopharm. Drug Disposit.* **17**, 273-310, 1996.