

## 審査の結果の要旨

氏名 廣田 徳子

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、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。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、*in vitro* / *in vivo* スケーリングにおいて問題となる諸要因の解析を行った。

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

ALP を 10 種類のヒト肝 MS あるいは CYP 発現系 (リンパ芽球様細胞系 CYP3A4 および Baculo virus CYP3A4 および CYP3A5) と NADPH 生成系存在下で incubation し、主代謝物である 4 位、 $\alpha$ 位水酸化体および親化合物を HPLC により定量した。代謝初速度より  $V_{max}$  ならびに  $K_m$  を算出し、その比から  $CL_{int}$  を算出した。CYP3A4 および CYP3A5 発現系の代謝試験で得られた  $CL_{int}$  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  $CL_{int}$  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  $\alpha$ 位水酸化に共通な  $\alpha$ 、 $\beta$  を求めた。

予測  $CL_{int} = CL_{int}(3A4) \cdot \alpha \cdot \text{CYP3A4 含量} + CL_{int}(3A5) \cdot \beta \cdot \text{CYP3A5 含量}$  (1) *in vivo* へのスケール・アップにおいては、1g 肝あたりの Ms の回収率を考慮し、 $CL_{int}$  を 1 g 肝臓あたりの値に換算した。文献情報から得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。ヒト肝 MS における ALP の 4 位および  $\alpha$ 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  $CL_{int}$  は、4 位水酸化の場合 CYP3A4 含量と、 $\alpha$ 位水酸化の場合 CYP3A5 含量との相関が良く、 $\alpha$ 位水酸化には CYP3A5 の寄与が大きいことが示唆された。

CYP 発現系に Cytochrome b5 を添加した試験では、代謝速度は 4 位および  $\alpha$ 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。発現系の  $CL_{int}$  は、式 (1) で得られた  $\alpha$ 、 $\beta$  で補正した場合、肝 MS と非常に近い値が得られた。 $CL_{int, in vivo}$  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。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 *in vivo* 薬物間相互作用の *in vitro* 試験からの予測

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。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 ( $R_c$ ) の定量的予測を行った。2 種類の肝 MS を用いた *in vitro* 代謝阻害試験により  $K_i$  値を算出し、各薬物の体内動態に関する文献情報を用いて  $R_c$  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。代謝阻害形式は、KET、CIM とも、4 位水酸化の場合競合、 $\alpha$ 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  $100\mu\text{M}$ 、 $\alpha$ 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  $I_u$  は  $37\mu\text{M}$ 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。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

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。ラットに 5, 10 mg/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。全血液/血漿濃度比を測定し、肝血流量の文献値を用いて肝アベイラビリティ (FH) を算出した結果、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、FH は約 0.6 と算出された。一方、 $12.6\text{ mg/kg}$  の十二指腸内投与を行い、循環血と門脈血との AUC の差により算出した吸収率と消化管アベイラビリティの積 ( $F_a \cdot F_g$ ) 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 30~50 倍肝の方が大きく、これは、in vivo の結果と一致した。また、ヒト同一ドナーの小腸および肝 MS について ALP の代謝試験を行った結果、ヒトにおいては、4 位水酸化の  $CL_{int}$  は肝は小腸の 7 倍、 $\alpha$ 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  $\alpha$ 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。

以上より、ALP の代謝活性について、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小さいことが示唆された。これらの研究結果は博士 (薬学) の学位を授与するに値するものと認めた。