

論文の内容の要旨

論文題目 *In vitro* データに基づいた *in vivo* 薬物間相互作用の定量的予測

氏 名 金 光 真 一

【序論】

1993 年、日本においてフルオロウラシル系抗ガン剤を服用していた患者が抗ウイルス薬 sorivudine を服用したところ、5-fluorouracil (5-FU) の血中濃度が上昇し、その毒性により死亡するという悲惨な事故が生じた。多剤併用療法が一般的となった近年、こういった事例を背景に薬物間相互作用の問題は大きな社会問題となり、医薬品を服用している患者あるいは医療関係者にとっても、その問題の重要性は高い。製薬企業の医薬品開発においても、スクリーニング段階から薬物間相互作用のリスクを可能な限り避ける努力がなされている。

薬物間相互作用の機序として、薬物代謝に起因した事例が最も多い。したがって、目的とする薬物の肝代謝を阻害することが知られている他の薬物を併用した場合に、その薬物の体内動態がどの程度変動するかについて定量的に予測することは、薬物間相互作用による毒性の発現を未然に防ぐ上で極めて重要な課題である。本研究では、生理学的薬物速度論の手法を用いて、*in vitro* 代謝データに基づく *in vivo* における薬物間相互作用の定量的な予測を試みた。このとき、false negative を避ける基本方針で予測を行い、相互作用は生じないと *in vitro* で予測されたにもかかわらず、*in vivo* では相互作用が生じることがないように注意した。

【本論】

<1> *In vivo* 薬物間相互作用の予測における阻害剤濃度の検討

臨床における基質濃度は多くの場合、ミカエリス-メンテン式におけるミカエリス定数 (K_m) と比較して十分低く、代謝阻害の程度 ($R = AUC (+inhibitor) / AUC (control)$, AUC : 血液中濃度下面積) は競合阻害と非競合阻害のとき、 $R = 1 + I_u / K_i$ と表される (I_u : 阻害剤フリー濃度, K_i : 対象薬物の代謝に対する阻害剤の阻害定数, 肝臓での挙動は well-stirred model を仮定)。代謝過程における相互作用の予測に関して false negative を避けるため、肝臓内代謝阻害剤の最大フリー濃度を肝動脈血と門脈血が合流して肝臓へ

流入する部分 (Fig. 1 中 lin) の最大フリー濃度 (lin,u) に近似し, lu の最大値として考えた。文献情報より得た K_i 値と lin,u との比較から *in vivo* での相互作用を定量的に見積もり, 多くの相互作用について実測値に近い予測値が得られた。しかし, 阻害剤濃度は時々刻々と変化するものであり, 固定値の lin,u を lu に代入して計算する本方法がどれだけ妥当であるかは明らかにされていない。そこで, 前述した方法により見積もった阻害剤の lin,u と生理学的フローモデルを用いて推定した循環血, 門脈血および肝臓中フリー濃度を比較した。

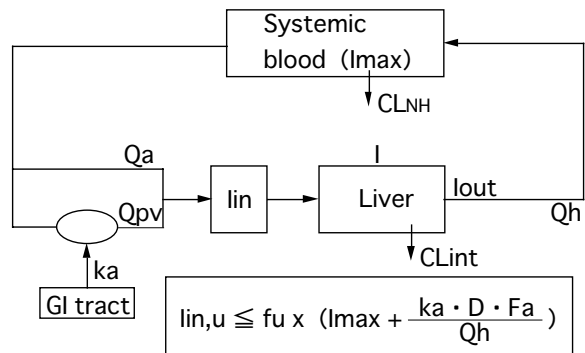


Fig. 1. Model for estimating inhibitor concentration at the inlet to the liver after oral administration.

阻害剤の吸収速度定数, 肝固有クリアランスおよび肝外クリアランスの変動により, lin,u は各コンパートメント中濃度に対して誤差を生じた。門脈血中最大フリー濃度に対しては 1.6 倍の範囲内であり, また肝臓中最大フリー濃度に対しては固有クリアランス (CL_{int}) が高値を示す場合において最も大きく影響され, 最大 11 倍の誤差であった。どのような阻害剤についても肝臓中フリー濃度を過小評価しないことから, false negative を避ける方針において, 最大の lu 値として lin,u を用いた薬物間相互作用の予測法は妥当であると考えた。

さらに, tolbutamide/sulfaphenazole の場合を例にあげ, 相互作用を定量的に予測した。Sulfaphenazole (500 mg, b.i.d.) は, 抗糖尿病薬 tolbutamide の CYP2C9 関与の代謝を阻害することにより, tolbutamide の AUC を 5.3 倍に増加させることが報告されている。Sulfaphenazole 濃度を lin,u に固定して予測した場合, tolbutamide の AUC は 4.1 倍に増加し, また sulfaphenazole 濃度推移を考慮した場合は 4.2 倍に増加することが予測され, *in vivo* の実測値とよく一致した。実際の肝臓中フリー濃度を過大評価している lin,u を用いても良い予測が得られた理由として, sulfaphenazole の臨床投与量においては CYP2C9 関与の代謝は完全に阻害されているものと考えられた。

<2> 阻害剤の肝臓における能動輸送に関する検討

阻害剤が受動輸送により肝臓へ移行する場合, 肝臓中フリー濃度は肝毛細血管中フリー濃度に等しいと仮定できる。しかし, 能動輸送が関与する際に, 阻害剤の血中濃度を基準にして阻害の程度を予測すると過小評価することになる可能性があるため, ラット遊離肝細胞を用いた検討を行った。

P450 代謝に対して阻害活性を示す quinidine, sulfaphenazole, erythromycin, ketoconazole, omeprazole を被験物質として用いた。遊離肝細胞を 37°C で 3 分間プレインキュベーションした後に薬液を添加して取込み実験を行った。細胞懸濁液を経時的にサンプリングし, medium と cell はシリコンレイヤー法で遠心分離して, それぞれの濃度を放射活性あるいは HPLC-UV により定量して取込み速度を算出した。Medium 中に FCCP あるいは rotenone を添加して細胞内の ATP を枯渇させ受動輸送を測定し, 一方コントロールでは受動輸送と能動輸送の合計が測定できることから能動輸送の寄与率を求めた。

いずれの薬物についても大きな能動輸送性 (C/M ratio : 肝細胞への濃縮率) は認めら

れず、予測される AUC 上昇率にも大きな影響はなかった (Table 1)。

しかしながら、ラットとヒトの細胞で種差があることも考えられるため、ヒト肝細胞あるいは肝スライスでの実測をすることで予測精度の向上が可能となるであろう。

<3> Mechanism-based inhibition に基づいた

Table 1. Prediction of *in vivo* drug-drug interactions in humans. a) The $l_{in,u}$ calculated based on the model in Fig. 1 was used as l_u . b) The product of the $l_{in,u}$ and the C/M ratio was used as l_u .

Inhibitor (Affected drug)	fh · fm	C/M ratio	-Active transport ^{a)}		+Active transport ^{b)}		Observed AUC ratio
			l_u/K_i	Predicted AUC ratio	l_u/K_i	Predicted AUC ratio	
Cimetidine (Theophylline)	0.52	x 4.3	0.05	x 1.0	0.2	x 1.1	x 1.5
Quinidine (Sparteine)	0.25	x 2.2	60	x 1.3	132	x 1.3	x 2.9
Erythromycin (Cyclosporine)	0.76	x 1.4	0.6	x 1.3	0.8	x 1.5	x 1.6
Sulfaphenazole (Tolbutamide)	0.80	x 1.2	200	x 5.0	240	x 5.0	x 5.3
Ketoconazole (Terfenadine)	0.58	x 1.2	4	x 1.3	5	x 1.3	> x 5.0
Omeprazole (Diazepam)	0.99	x 1.0	0.03	x 1.0	0.03	x 1.0	x 2.0

triazolam/erythromycin 相互作用の定量的予測

Erythromycin などのマクロライド系抗生物質による薬物間相互作用には、CYP3A による代謝過程で生成したニトロソアルカンが CYP3A と解離しにくい複合体を形成するため、CYP3A が不活性化される mechanism-based inhibition が関与していることが報告されている。この場合、阻害剤が体内から消失した後でも、なおかつ阻害効果が残存することになり、一般的な可逆的阻害の場合よりも深刻な副作用につながる事が考えられ、十分な注意が必要である。さらに、このような場合には *in vivo* の相互作用を予測する際、阻害剤と酵素との接触時間や酵素の turnover を考慮した解析を行うことが必要である。

CYP3A4 の基質として triazolam を例にあげ、その代謝物として α -および 4-OH triazolam に着目した。ヒト肝ミクロソームおよび CYP3A4 発現系を用いた代謝阻害実験では、3 分間のインキュベーション後に α -および 4-OH triazolam を定量し、NADPH 存在下 erythromycin とミクロソームとのプレインキュベーション時間と erythromycin 濃度の影響を検討した。プレインキュベーションをしない場合にはほとんど阻害が観察されなかったのに対して、プレインキュベーション時間依存的に阻害が増強された。また、CO 差スペクトルにより求めた残存している活性型 CYP3A 濃度も erythromycin とのインキュベーションにともなって減少することから、阻害は mechanism-based inhibition による事が示唆された。 k_{inact} と K'_{app} に表される阻害の速度論パラメータと文献情報より得られた薬物動態パラメータを用いて、生理学的フローモデルにより *in vivo* の相互作用を定量的に予測した。ヒトミクロソームおよび CYP3A4 発現系から得られた阻害パラメータから erythromycin の前投与 (333 mg, t.i.d., 3 days) により triazolam の AUC はそれぞれ 2.0 および 2.6 倍に増加することが予測され、*in vivo* における報告値 (2.1 倍) とよく一致した。

<4> Mechanism-based inhibition に基づいた 5-FU/sorivudine 相互作用の定量的予測

5-FU/sorivudine 相互作用機構は、sorivudine が腸内細菌により (E)-5-(2-bromovinyl) uracil (BVU) になり、さらに 5-FU の代謝律速酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) により代謝活性化されて、生じた活性型 BVU が DPD 自身と結合する

mechanism-based inhibition であったことが明らかにされている。したがって, sorivudine による阻害の場合にも, *in vitro* 試験により *in vivo* の相互作用を予測する際には, erythromycin の場合と同様な解析を行うことが必要である。

In vitro 試験では, ラット, ヒト肝サイトソルおよびヒト recombinant DPD (rhDPD) を用いて, 5-FU 代謝に対する BVU の阻害試験を行った。いずれの酵素を用いても, NADPH 存在下で BVU と酵素をプレインキューベ

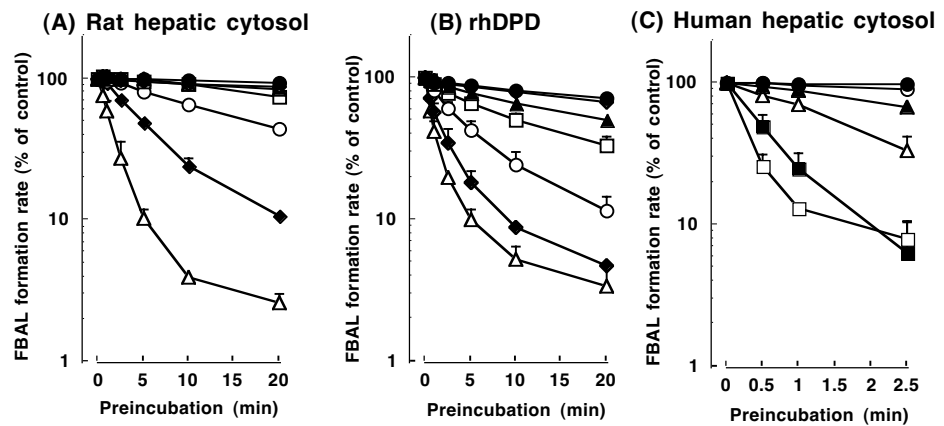


Fig. 2. Inhibitory effects of BVU on 5-FU metabolism in rat hepatic cytosol (A), rhDPD (B), or human hepatic cytosol (C). BVU concentrations were: ●, 0; ◇, 0.03; ▲, 0.1; □, 0.3; ○, 1; ◆, 5; and △, 20 μ M for (A) and (B); ●, 0; ○, 1; ▲, 3; △, 10; ■, 50; and □, 200 μ M for (C).

ションした時間と BVU 濃度に依存した阻害の増強が認められた (Fig. 2)。 k_{inact} と K'_{app} に表される阻害の速度論パラメータと文献情報より得られた基質と阻害剤の薬物動態パラメータを用いて, 生理学的フローモデルにより *in vivo* の相互作用を定量的に予測した。ラットにおいては BVU の投与により DPD は完全に阻害され, 5-FU の AUC が 11 倍に増加する予測値を得て, *in vivo* における報告値とよく一致した。ヒトにおいては 150 mg/day, 5 日間の sorivudine 投与により 5-FU の AUC が 5 倍に上昇することが予測された。Sorivudine 1錠 (50 mg) を服用したとき, 肝臓中 DPD は 95 %が不活化され, 正常レベルまでに回復するにはおよそ 2 週間が必要であることがシミュレーションにより確認された。薬物代謝阻害に mechanism-based inhibition が関与する場合には, ヒトに薬物が投与されたとき多大な危険を伴うことが推測された。

【結論】

遺伝子工学が発展したことでヒト型代謝酵素発現系も市販され, ヒト試料も購入可能な近年, 本研究で示した *in vitro* 試験結果を用いたシミュレーションによる薬物間相互作用の検討も容易に実施できるようになった。厚生労働省医薬局審査管理課長通知「薬物相互作用の検討方法について」(医薬審発第 813 号, 2001 年 6 月 4 日)には, ここで示した薬物間相互作用の定量的予測法が色濃く反映されている。代謝酵素と被験物質をプレインキューベーションする時間と被験物質濃度の影響を検討することで, 阻害機構を見極めることが非常に重要なポイントとなる。特に, mechanism-based inhibition が関与する場合, 可逆的阻害として *in vivo* 薬物間相互作用を予測すると過小評価する可能性に留意しなければならない。医薬品を開発する段階でこういった検討を実施することで, より安全な医薬品を上市することが可能になるであろうし, 併用することが危険な医薬品あるいは食品も見出すことができるだろう。再び sorivudine 薬害のような悲惨な事故が起きることがないように, 人類の QOL (Quality of Life) を高めることが製薬企業の使命であると考えている。