

試験管内反応で薬物相互作用を予測する

バイオ技術センター 日根 智恵美 / 板橋 佳代 / 西山 千晶 / 水野 佳子

1 はじめに

多数の死者を出したソリブジン事件は、作用的に全く関係の無い薬剤の併用により重篤な副作用が発現したことで世間を驚かせた。原因は、薬物代謝酵素の阻害による思いがけない作用の増強で、他剤併用による薬物相互作用への注意が大いに喚起されることとなった。現在では、臨床で他剤との併用により重篤な薬物相互作用が起こる可能性について評価することは、薬を開発する上で重要かつ必須な項目となっており、平成13年に検討方法のガイドラインも出されている¹⁾。

ヒトの体内に摂取された薬物は主に肝臓の酵素によって代謝され、活性を失ったり、水への溶解度が増加して尿や胆汁中に排泄されるようになる。薬物の代謝は、体内に入った薬物が解毒・除去されるための重要なシステムである。従って、薬物代謝酵素が阻害されると、体内の薬物濃度が予想以上に上昇したり長期間残存するといったことが起こり、薬物の作用や副作用が増強され、致命的な症状が発現する場合がある。実際の臨床報告例からも薬物相互作用で問題が生じる場合の多くが、代謝酵素の阻害に基づくものであることが明らかになっている。ヒトの薬物代謝酵素として最も重要なものは、

肝臓のチトクロームP450 (CYP) だが、近年、ヒト肝臓由来試料(ヒト肝ミクロソーム)を利用して試験管内で薬物代謝反応を調べることに、CYPに対する阻害の強さを調べるのが可能となった。具体的には、CYPによる代謝反応に対して阻害作用を示す薬物(阻害剤I)の阻害定数(K_i)を求めることにより、血中阻害剤の濃度[I]や蛋白結合率等の薬物動態パラメータと組み合わせることで相互作用の程度を予測することが可能である。当社では、超微量分析法を応用した薬物相互作用の解析技術(K_i 測定)を確立した。

2 K_i を求める一般的な手順

CYPによる薬物の代謝反応は、以下のMichaelis-Mentenの式に従うことが知られている。

$$v = V_{max} \cdot [S] / (K_m + [S])$$

ここで v は反応速度、 $[S]$ は初期薬物濃度、 V_{max} は最大反応速度、 K_m は $1/2 \cdot V_{max}$ を与える $[S]$ である。 v は薬物の代謝反応によって生成する

代謝体の生成速度を測定することによって求められ、 $[S]$ と v の関係から K_m と V_{max} を求めることができる(具体的には式から誘導されるLineweaver-BurkまたはEadie-Hofsteeの式から求められる)(図1)。

次に、薬物濃度 $[S]$ を K_m 付近に固定して、阻害剤の濃度を変化させて反応系に添加した場合の v を測定し、 v が V_{max} の $1/2$ になる阻害剤濃度 $[I]$ (IC_{50})を求める(図2)。 IC_{50} も酵素阻害の強さを示す数値で、 K_i の代用として利用できる。

最後に、3濃度の薬物濃度 $[S]$ (一般的に K_m をはさむ3濃度が目安となる)のそれぞれについて、阻害剤濃度 $[I]$ を IC_{50} を含む範囲で変化させて v を測定する。薬物の濃度毎に、

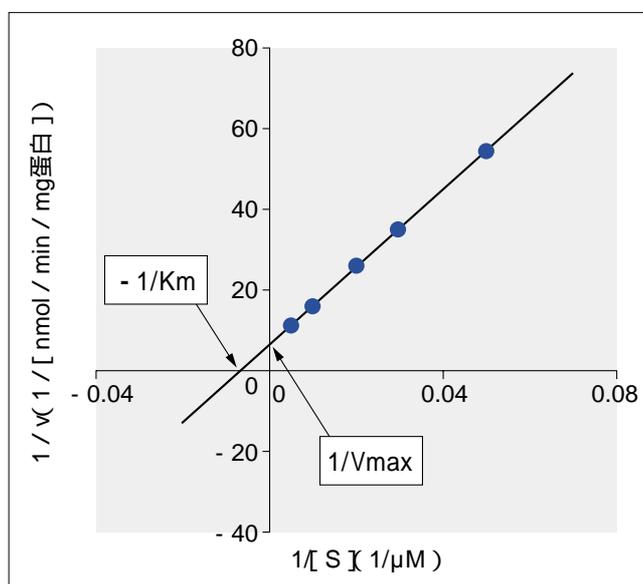


図1 酵素反応のLineweaver-Burk Plotによる K_m および V_{max} の算出

阻害剤濃度 [I] に対して $1/v$ をプロット(Dixonプロット)して、3本の直線の交点を与える阻害剤濃度 [I] (-Ki) からKiが算出される(図3)。

3 実務上の問題点と対策

目的とする代謝反応速度 v は、薬物からその代謝反応によって生じる代謝体の生成速度で測定するが、そのためには代謝体の標準品が必要となる。しかし、臨床において併用される可能性のある薬物の数は非常に多く、相互作用を調べなければならない薬物は、絞り込んでも10種類程度になることが稀でない。それらの併用薬の多くは委託者自身の製品ではなく、薬物そのものの入手はできたととしても検討すべき全ての代謝体標準品を入手することは殆ど不可能と考えられる。そこで当社では、代謝体の生成でなく未変化体の減少で v を測定する方法も推奨している。もう一つの問題点は、最近の薬物が微量で効果を示すため臨床有効薬物濃

度が低下し、試験管内での代謝反応も非常に低い濃度で実施しなければならないことである。薬物の反応初期濃度 [S] は数 μM (あるいはそれ以下) に設定される場合があり、酵素反応後の残存濃度はさらに低くなるので、超微量薬物濃度の定量が必要となる。この問題を解決するために、当社では、測定に高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)を用いている。特に、代謝体生成でなく未変化体減少で代謝反応速度を求める場合には、反応前後の濃度差から変化量を求めるために誤差が大きくなり易く、堅牢な分析法を確立するとともに、熟練した分析者が厳しい精度管理下で測定を実施することが必要である。

4 テストステロンの代謝に対するケトコナゾールの阻害の解析

ヒトCYP分子種のうちCYP3A4は肝臓における含量が最も多

く、多くの医薬品の代謝に関わっていることから、最も重要な分子種であり、臨床で認められている薬物代謝阻害に起因する薬物相互作用も、CYP3A4に関連したものが最も多い²⁾。CYP3A4の代謝活性は一般的にテストステロンの6水酸化反応によって評価される。また、CYP3A4を阻害する薬剤として最も代表的なものは、アゾール系抗真菌剤のケトコナゾールであり、CYP3A4の典型的阻害剤としてミクロソーム代謝阻害評価試験等に使用される³⁾。今回、このテストステロンを指標としたCYP3A4代謝活性に対するケトコナゾールの阻害の程度を、未変化体の減少を測定することによって評価した具体例を示す。

【定量法】

内部標準(IS)にメチルテストステロンを用いたHPLC-UV(カラム:

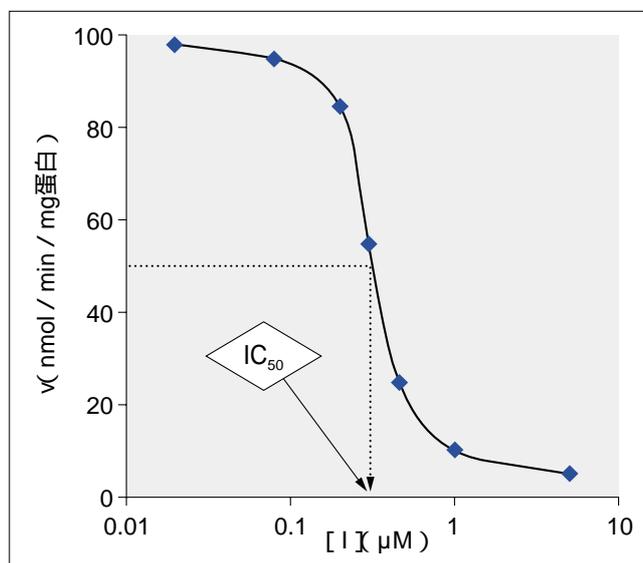


図2 反応阻害曲線から IC_{50} の算出

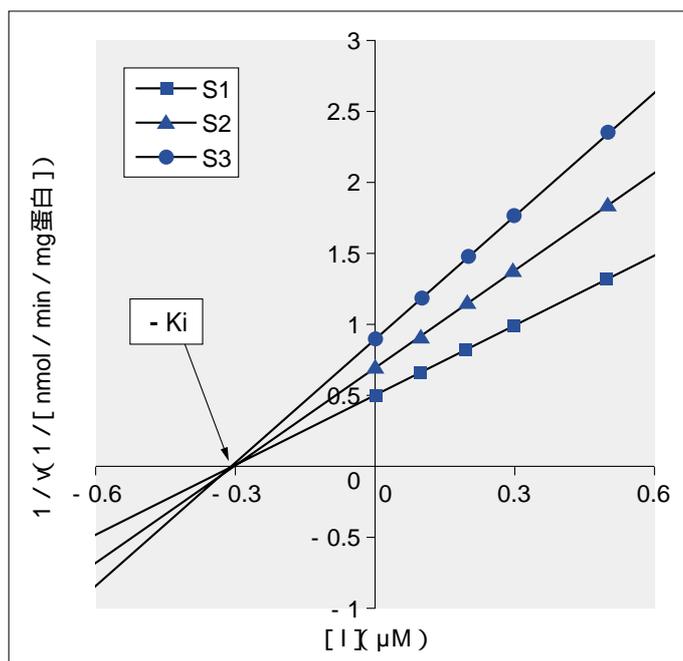


図3 Dixon Plotによる阻害定数 K_i の算出

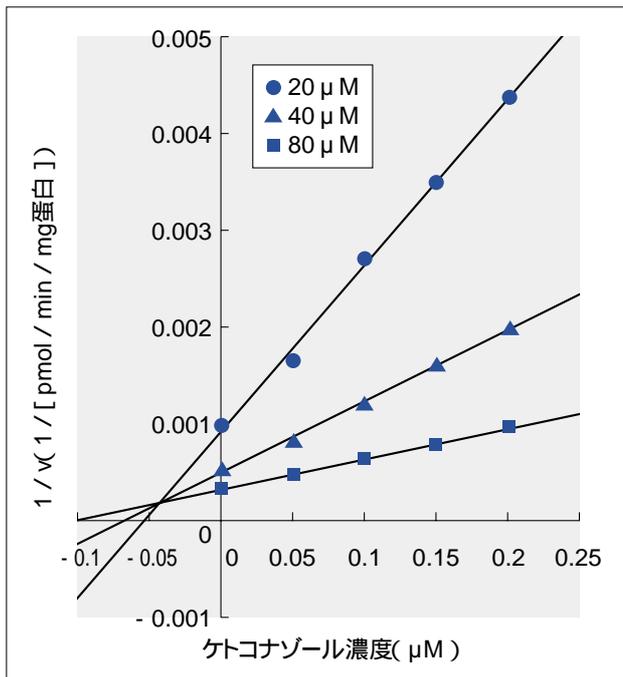


図4 テストステロン代謝に対するケトコナゾールのKi算出

SUMIPAX-ODS)で測定した。テストステロン濃度2~200 μmol/Lで検量線に良好な直線性が認められた。

【代謝反応条件】

ガラス製試験管に500mmol/Lリン酸塩緩衝液(pH7.4)(終濃度100mmol/L),市販のヒト肝ミクロソーム(20mg/mL),基質テストステロン溶液(終濃度[S]),さらに阻害試験では阻害剤ケトコナゾール溶液を加え,37℃で10分間プレインキュベーションしたのち10mmol/L NADPH溶液(終濃度1mmol/L)を加えることにより反応を開始した。37℃で所定時間反応後,氷冷メタノールを添加することにより反応を停止させた。反応液にIS溶液を添加後遠心分離し,上清中のテストステロン濃度を測定した。反応0時間との濃度差からテストステロンの減少量を計算し,反応速度vを求めた。

【結果】

テストステロンの減少が直線的に進行する反応条件を検討し,反応時間(20分),ヒト肝ミクロソーム濃度(0.5mg蛋白/mL)及びテストステロン初期濃度範囲(20~200 μmol/L)を決定した。テストステロンの濃度を变化させてvを測定し, Lineweaver-Burkプロットから,テスト

ステロンのKm(201 μmol/L)を求めた。次にテストステロン濃度を80 μmol/Lに設定し,ケトコナゾール濃度を变化させてvを測定してIC₅₀(111nmol/L)を求めた。さらに,テストステロン濃度を20,40及び80 μmol/Lと設定し,それぞれケトコナゾール濃度を0~300nmol/Lと变化させてvを測定し,DixonプロットによりKi(42nmol/L)を求めた(図4)。この値は文献値⁴⁾とほぼ一致した。

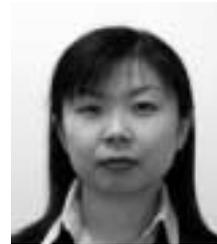
5 今後の方向性

薬物未変化体の減少で相互作用を評価する方法は,複数の代謝反応が存在する場合,それらを総合的に評価しており,個々の代謝反応を評価できていない等の問題点を抱えているが,代謝体標準品を必要としない点では非常に実用的であり,十分有用性があると考えられる。代謝体

標準品入手の可否,代謝に関与するCYP分子種とそのKmやVmax等の情報,分析する薬物濃度(必要な分析感度)等,個々の薬物の実情に即して適切な試験法を選択することが必要と考えられる。

文 献

- 1) 薬物相互作用の検討方法について,厚生労働省ガイドライン,医薬審発 813号,平成13年6月4日
- 2) E. Y. Michalets, *Pharmacotherapy*, 18, 84-112 (1998).
- 3) Dierks E. A. *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, 29, 23-29 (2001)
- 4) Sai *et al.*, *Xenobiotica*, 30, 327-343 (2000).



日根 智恵美
(ひね ちえみ)
バイオ技術センター



板橋 佳代
(いたはし かよ)
バイオ技術センター



西山 千晶
(にしやま ちあき)
バイオ技術センター



水野 佳子
(みずの よしこ)
バイオ技術センター