

# 自動分注装置を用いたCYP阻害能評価試験

医薬事業本部 ファーマ事業所 熊谷 真希・相沢 詩織・吉田 昌平・日根 智恵美

## 1 はじめに

医薬品の併用により発生する重篤な副作用を回避するため、薬物相互作用についての予測検討の重要性が強調され始めてから、既に10年以上が経過している。医薬品の開発にかかる期間と費用は、近年、ますます増加の一途を辿っている。そのため、医薬品の副作用による開発中止は製薬企業にとって多大な損失となる。このことから、開発の初期段階で、薬物相互作用による副作用の発生の可能性を確認しておくことは、製薬企業にとって重要な検討事項のひとつとなっている。

薬物相互作用の主な原因のひとつはシトクロームP450 (CYP) と呼ばれる一連の代謝酵素群に対する薬物による阻害である。CYPは生体内に取り込まれた異物を体外に排泄しやすい形に変換する酵素であり、基質特異性が低いことを特徴とする。

また、多数の分子種がヒトで同定されているが、そのうち主に9分子種 (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 及び 3A4) が薬物の代謝に関わるとされる。中でも、CYP3A4で代謝される薬物が現在市販されている医薬品の大半を占めるといわれる。

服用された薬物は生体内に取り込まれ、主として肝臓でCYPによる代謝を受ける。通常、薬物の投与量は、代謝を含めた体内動態をもとに薬効が発揮され、なおかつ、安全に服用できるように設定される。しかしながら、複数の薬物を服用すると、一方の薬物が酵素の働きを阻害することにより、他方の薬物の代謝に影響を与え、血中濃度が治療域 (薬効が発揮される濃度範囲) を超えて上昇し、毒性が発現することがある。このため、治療域が狭い薬物の場合、臨床において重篤な副作用の原因と

なる。

このような状況を踏まえて、日米欧の行政当局からは、薬物相互作用の検討についての指針が出されている。1997年に米国で *in vitro* における薬物相互作用検討ドラフトガイダンス<sup>1)</sup> が発布され、1999年に *in vivo* における薬物相互作用検討ガイダンス<sup>2)</sup> が制定されている。なお、*in vitro* 薬物相互作用検討ガイダンスは2006年9月に改訂された。また、欧州においても同様のガイダンスが1997年に出されている。わが国では2001年6月4日に「薬物相互作用の検討方法について」(医薬審発第813号) が制定されている。これらを参考として、CYP阻害による薬物相互作用を発生する可能性のある薬物をスクリーニングし、その阻害の程度や阻害機構を *in vitro* で検討する手法を開発した。なお、代謝反応は自動分注装置による自動化を行い、

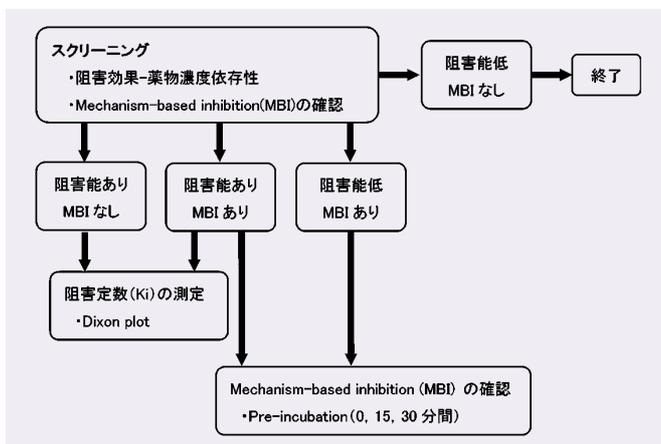


図1 CYP阻害試験の概要

表1 指標代謝反応一覧

CYP分子種	指標反応
1A2	フェナセチンO-脱エチル化
2A6	クマリン7-水酸化
2B6	プロピオン水酸化
2C8	パクリタキセル6'-水酸化
2C9	ジクロフェナク4'-水酸化
2C19	S-メフェニトイン4'-水酸化
2D6	プフラロール1'-水酸化
2E1	クロルゾキサゾン6-水酸化
3A4	テストステロン6'-水酸化
	ミダゾラム1'-水酸化

測定はLC-MS/MSを使用し、GLP基準での測定を実施できるようにした。

## 2 CYP阻害試験の概要

CYP阻害試験の概要を図1に示した。

### 2.1 スクリーニング

まず、スクリーニング試験として、CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1及び3A4を対象として薬物による阻害の有無を検討する。指標反応として、米国食品医薬品局（FDA）及び厚生労働省が推奨する反応から、表1に示す10種類の代謝反応を選択した。なお、CYP3A4には基質結合部位が2箇所以上存在することが知られているため、2種以上の指標反応にて阻害を検討することが推奨されている。また、被験物質を溶解する溶媒はCYPの活性を変化させる可能性があるため、特定のCYP分子種毎に最適な溶媒を選択しなければならない。例えば、CYP2E1の基質としてクロルゾキサゾンを使用した反応において、0.2%のアセトニトリルは影響を与えないが、0.2%のジメチルスルホキシド（DMSO）は阻害作用（>80%）を示す。このことから、新規薬物を溶解する溶媒としてDMSOを選択した場合、阻害作用は誤って見積られることとなる。分子種毎に適切または不適切な溶解溶媒を文献調査し、最適な溶解溶媒を使用することとした。以上の点を考慮した上で、各指標反応に対する可

逆の阻害及び不可逆的阻害の有無を確認する。

可逆的阻害検討では、EDTA - リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）及びヒト肝マイクロソーム（肝臓をホモジネートし、超遠心分離によりCYPを含む画分を分離したものを）を含む代謝反応系に、最終的な濃度が検討する濃度となるように調製した被験物質溶液5  $\mu$ Lを添加後、基質溶液を5  $\mu$ L添加して、プレウォーミングを開始する。37  $^{\circ}$ Cでプレウォーミング後、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）溶液を1mmol/Lとなるように添加して、代謝反応を開始し、37  $^{\circ}$ Cで一定時間反応後、冷却した溶媒を反応系容量と等量添加して、反応を停止させる。

一方、NADPH存在下で、ヒト肝マイクロソームとインキュベーションすることにより、CYPを不可逆的に失活させるものが存在する。これは、不可逆的阻害または、Mechanism-based inhibition（MBI）と呼ばれ、特に重篤な副作用の原因となることがある。MBIの検討においては、代謝反応は以下のように実施する。EDTA - リン酸カリウム緩衝液（pH7.4）及びヒト肝マイクロソームを含む代謝反応系に被験物質溶液5  $\mu$ Lを添加して、37  $^{\circ}$ Cでプレウォーミングを実施する。NADPH溶液を1mmol/Lとなるように添加して、プレインキュベーションを0, 15または30分実施後、基質溶液5  $\mu$ Lを代

表2 バリデーション項目

- ・ 特異性
- ・ 添加検量線の直線性
- ・ 同時（日内）再現性
- ・ 日差再現性
- ・ 前処理後安定性
- ・ 試料調製後安定性
- ・ 標準溶液安定性

謝反応系に添加し、代謝反応を開始する。37  $^{\circ}$ Cで一定時間反応後、冷却した溶媒を反応系容量と等量添加して、反応を停止させる。

上記の代謝反応を実施後、生成された代謝物をLC-MS/MSにより定量する。なお、10種類の代謝物についてGLP基準下で測定法バリデーションを実施した。バリデーション項目を表2に示す。代謝物の定量値から、単位時間（分）、マイクロソーム1mg当たりの代謝物生成量を算出し、代謝速度（ $v$ ）を算出する。

### 2.2 $IC_{50}$ 及び $K_i$ 値の算出

スクリーニングにおいて可逆的阻害が認められたCYP分子種について、 $IC_{50}$ 及び $K_i$ 値の算出を行う。被験物質濃度が0のときの値（コントロール）に対する百分率を残存活性とし、残存活性が50%となる被験物質の濃度を $IC_{50}$ として算出する。また、 $K_i$ 値の算出は以下の手順で実施する。基質濃度（3濃度）ごとに、代謝速度（ $v$ ）の逆数（ $1/v$ ）を $Y$ 、被験物質濃度を $X$ とし、最小二乗法により一次回帰式（ $Y = aX + b$ ；重みなし）を算出する。ここで直線の交点の $X$ 軸座標の絶対値を平均して、

これをKiとする。本プロットは Dixon plotと呼ばれ、交点の座標から阻害形式を推測することができる。

### 2.3 MBIパラメーター算出

スクリーニングにおいて、不可逆的阻害が認められたCYP分子種について、MBIパラメーター ( $K_{(app)}$  及び  $k_{inact}$ ) の算出を実施する。ヒト肝ミクロソームと被験物質をNADPH存在下、基質を含まない反応液中でプレインキュベーション後、反応液を分取して、基質を含む反応液に添加する。生成された代謝物の

定量値からMBIパラメーターを次示す方法で算出する。

残存酵素活性の自然対数をY、プレインキュベーション時間をXとし、その傾きが直線的である範囲における傾きを酵素不活性化速度定数 ( $k_{obs}$ ) とする。被験物質濃度毎に傾き ( $k_{obs}$ ) を算出する。得られた  $k_{obs}$  及び被験物質濃度を非線形最小二乗法により  $K_{(app)}$  及び  $k_{inact}$  を算出する。

$$k_{obs} = k_{inact} \cdot [I] / (K_{(app)} + [I])$$

[I] : 被験物質 (阻害剤) 濃度  
 $k_{obs}$  : 酵素不活性化速度定数  
 $k_{inact}$  : 最大酵素不活性化速度定数  
 $K_{(app)}$  : 酵素と阻害剤の見かけの解離定数

(酵素不活性化速度定数  $k_{obs}$  が  $k_{inact}$ )

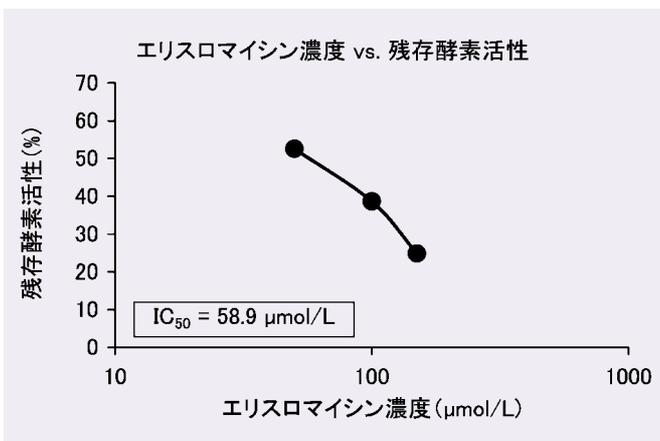


図2 可逆的阻害スクリーニング結果 (エリスロマイシン)

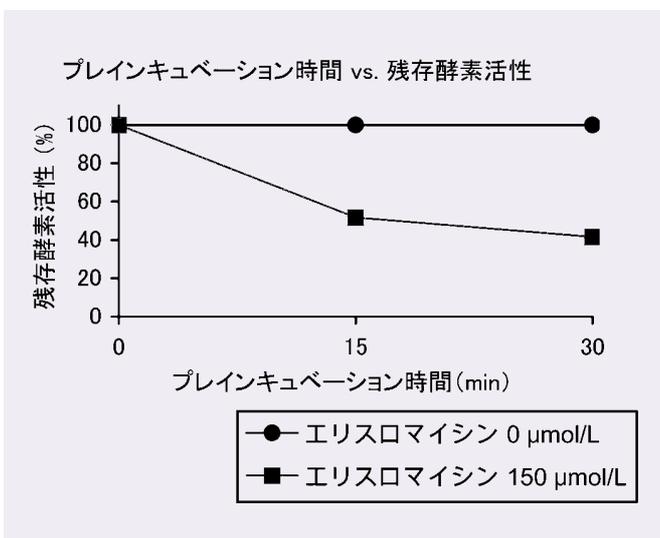


図3 不可逆的阻害スクリーニング結果 (エリスロマイシン)

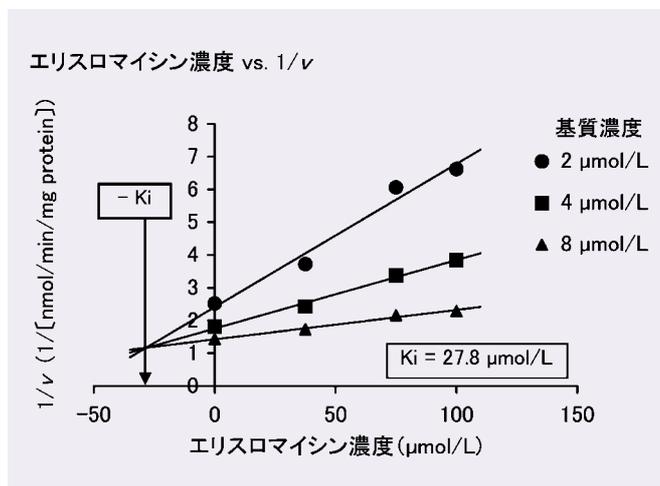


図4 CYP3A4 (ミダゾラム1'-水酸化活性) に対するKi値算出

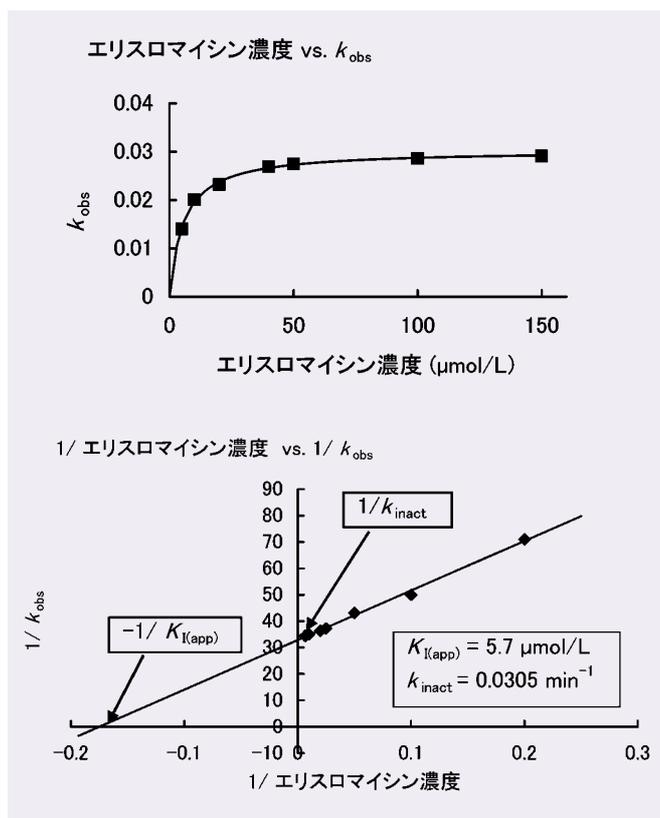


図5 MBIパラメーター算出

表3 エリスロマイシンによるミダゾラム 1'-水酸化(CYP3A4)に対する阻害試験結果の比較

	IC <sub>50</sub>	Ki	K <sub>I(app)</sub>	k <sub>inact</sub>
自動分注装置	58.9 μmol/L	27.8 μmol/L	5.7 μmol/L	0.0305 min <sup>-1</sup>
マニュアル法	81.4 μmol/L	21.9 μmol/L	21.5 μmol/L	0.0286 min <sup>-1</sup>
文献値	15.4 μmol/L	10.9 μmol/L	41.4 μmol/L	0.0423 min <sup>-1</sup>

の半分となるときの阻害剤濃度)

### 3 自動分注装置による自動化

以上に示した代謝反応を、自動分注装置を用いて自動化した。自動分注装置のプログラムを最適化することにより、検討の初期段階でC.V.値22.3%であったメタノール5 μLの分注精度はC.V.値3.4%となり、より精密な代謝反応が可能となった。最適化した内容はピペティング方法、液の吐出スピード及び液の吸引前後に吸引する空気の量である。なお、吸引吐出する液の粘性等により最適な条件が異なるため、使用するすべての溶液に対しこの最適化を行った。分注精度を確保した後、スクリーニング、IC<sub>50</sub>及びKi値の算出及びMBIパラメーター算出のプログラムを整備し、一連の試験を自動分注装置で実施できるようにした。

### 4 試験例

代表的なCYP3A4阻害剤として知られるマクロライド系抗生物質エリスロマイシンを用い、モデル試験を実施した。その結果、CYP3A4に対して可逆的阻害(図2)及び不可逆的阻害(図3)が見られた。CYP3A4(ミダゾラム1'-水酸化活性)に対するIC<sub>50</sub>、Ki値(図4)、

MBIパラメーターを算出(図5)し、マニュアルで実施した値ならびに文献値<sup>3)4)</sup>とほぼ同等であることを確認した(表3)。

これらの結果から、自動分注装置を用い、正確かつ迅速にCYP阻害試験を実施することが可能となった。なお、従来、マニュアル法によりCYP阻害試験を実施した場合、スクリーニング試験開始からすべての結果の速報を提出するまでに4ヶ月程度の期間を要していたが、1ヶ月程度の期間で実施することが可能である。

### 5 おわりに

自動分注装置を用いて自動化することにより、正確かつ迅速なCYP阻害試験の実施が可能となった。CYP阻害試験は医薬品の開発の比較的初期段階で実施する必要があり、自動分注装置を用いた本手法は申請時に必要な信頼性基準以上での試験実施のみならず、多数の開発剤のCYP阻害能を簡便に評価する際にも有用である。より良い医薬品を世の中に少しでも早く送り出すために、当社の技術力で貢献したいと考えている。

### 文献

- 1) Guidance for Industry; Drug Interaction Studies Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling, Draft Guidance (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), (September 2006).
- 2) Guidance for Industry; In Vivo Drug Metabolism/Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, and Recommendations for Dosing and Labeling. (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), (November 1999).
- 3) K Ito, K Ogihara, S Kanamitsu, and T Itoh, Drug Metab Dispos. 31:945-954, 2003
- 4) Donavon J. McConn II, et al., Drug Metab Dispos. 32:1083-1091, 2004



熊谷 真希  
(くまがい まき)  
医薬事業本部  
ファーマ事業所



相沢 詩織  
(あいざわ しおり)  
医薬事業本部  
ファーマ事業所



吉田 昌平  
(よしだ しょうへい)  
医薬事業本部  
ファーマ事業所



日根 智恵美  
(ひね ちえみ)  
医薬事業本部  
ファーマ事業所