

●カクテル基質法による *in vitro* CYP 阻害試験

TN439

Cytochrome P450 Inhibition Assays Using Cocktail Probe Substrates *in vitro*

[概要]

チトクローム P450(以下 CYP)は薬物代謝に関わる最も重要な酵素群です。CYP には複数の分子種が存在し、薬物動態学的な相互作用の多くはこれら CYP 活性の阻害に基づきます。CYP 阻害試験は創薬初期段階のスクリーニング試験でも重要な項目の一つとなっています。

CYP 阻害の様式には「可逆的阻害」と「不可逆的阻害(mechanism based inhibition : MBI)」の大きく 2 種類があり、特に MBI に基づく CYP 阻害は重篤な副作用等を引き起こす可能性があります。

当社では、ヒト肝ミクロソームを用いて、カクテル基質法により主要な CYP 7 分子種(CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、3A4)に対する被験化合物の阻害効果ならびに阻害様式を迅速に同時評価する受託サービスを実施しております。

[特長]

1. 全自動分注装置を用いることで、高速、かつ正確に多検体処理が実施できます。
2. IC₅₀ の算出および MBI の有無の判定を実施いたします。
3. カクテル基質法により、薬物代謝に関わる CYP 7 分子種の同時評価が可能です。

[実施例]

項目 1 : IC₅₀ の算出

各 CYP 分子種への阻害作用が知られている化合物を用いて、カクテル基質法にて試験を実施し、IC₅₀ を算出しました。単独基質にて試験を実施した文献値^{3) 4) 5)}と比較したところ、各分子種ともに同等の結果が得られており、信頼性の高い評価系であることが示唆されました。カクテル基質法により、単独基質での試験と比較して、大幅に時間が削減でき、また必要な化合物量も少なく済みます。

表 1 代表的阻害剤における IC₅₀ 値の比較

CYP 分子種	基質	代謝物	被験物質 (阻害剤)	IC ₅₀ (μmol/L)	
				カクテル 基質法	単独 基質法
1A2	Phenacetin	Paracetamol	α-Naphthoflavone	0.0026	0.0091 ³⁾
2B6	Bupropion	Hydroxybupropion	Ticlopidine	0.18	0.27 ³⁾
2C8	Amodiaquine	Desethylamodiaquine	Quercetin	3.9	3.9 ⁴⁾
2C9	Diclofenac	4'-Hydroxydiclofenac	Sulfaphenazole	0.62	0.52 ³⁾
2C19	(S)-Mephenytoin	4'-Hydroxymephenytoin	Benzylinirvanol	0.43	0.41 ³⁾
2D6	Bufuralol	1'-Hydroxybufuralol	Quinidine	0.21	0.18 ⁵⁾
3A4	Midazolam	1'-Hydroxymidazolam	Ketoconazole	0.017	0.016 ³⁾

項目 2 : MBI 有無の判定

カクテル基質法にて、CYP3A4 の可逆的阻害剤として知られる Ketoconazole と、MBI 阻害剤として知られる Erythromycin を用いて試験を実施した際の残存活性率 (%) のグラフを図 1、2 に示します。

被験物質に MBI 作用がある場合、NADPH (補因子) 存在下でのプレインキュベーション後に基質を添加し反応を開始することにより、 IC_{50} が低下することが知られております³⁾。Ketoconazole では NADPH 存在下でのプレインキュベーションの有無による阻害の差は見られませんが、Erythromycin では NADPH 存在下でのプレインキュベーションにより IC_{50} が低下しており、MBI 作用を確認できました。

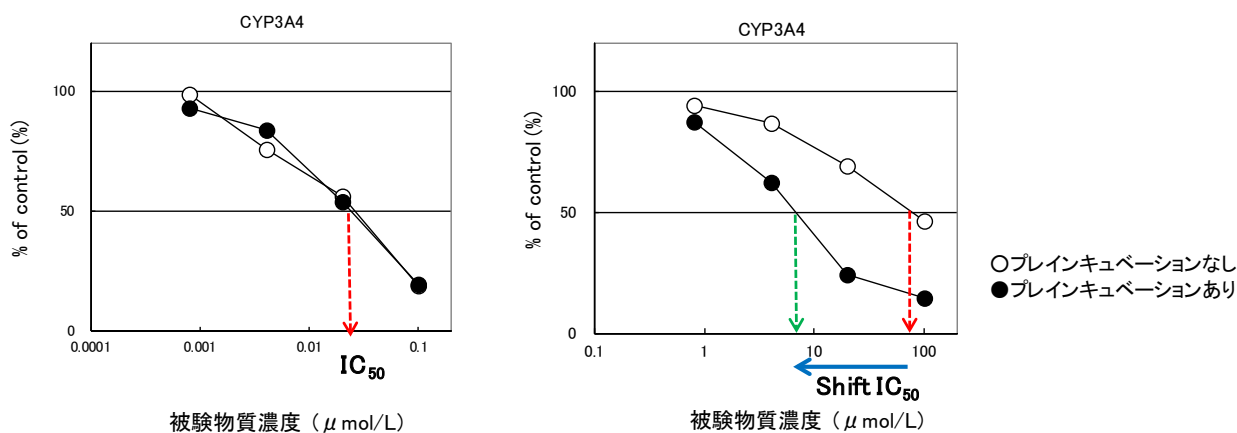


図 1 Ketoconazole 添加時の残存活性率(%)

図 2 Erythromycin 添加時の残存活性率(%)

当社では、お客様のご要望に応じた試験デザインでの実施も承っております。お気軽にご相談下さい。

[参考文献]

- 1) 吉成 浩一, チトクロム P-450 の阻害に基づく薬物相互作用 *日薬理誌* **2009**, *134*, 285-288.
- 2) Kozakai, K.; Yamada, Y.; Oshikata, M.; Kawase, T.; Suzuki, E.; Haramaki, Y.; Taniguchi, H. Reliable high-throughput method for inhibition assay of 8 cytochrome P450 isoforms using cocktail of probe substrates and stable isotope-labeled internal standards. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2012**, *27(5)*, 520-529.
- 3) Perloff, E. S.; Mason, A. K.; Dehal, S. S.; Blanchard, A. P.; Morgan, L.; Dandeneau, Ho, A.; Crocker, R. M.; Chandler C. M.; Boily, N.; Crespi, C. L.; Stresser, D. M. Validation of cytochrome P450 time-dependent inhibition assays: a two-time point IC_{50} shift approach facilitates kinact assay design. *Xenobiotica*, **2009**, *39(2)*, 99-112.
- 4) Walsky, R. L.; Gaman, E. A.; Obach, R. S. Examination of 209 drugs for inhibition of cytochrome P450 2C8. *J Clin Pharmacol.* **2005**, *45(1)*, 68-78.
- 5) Yin, H.; Racha, J.; Li, S.-Y.; Olejnik, N.; Satoh, H.; Moore, D. Automated high throughput human CYP isoform activity assay using SPE-LC/MS method: application in CYP inhibition evaluation. *Xenobiotica*, **2000**, *30(2)*, 141-154.

[関連技術リンク]

当社では創薬初期段階での探索的薬物動態評価試験を幅広く取り揃えております。

ヒト肝細胞を用いた in vitro CYP 誘導能評価系の構築

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn394.pdf>