

CYP3A4 の基質を用いた小腸代謝活性の種差について

バイエル薬品中央研究所探索薬物動態

小村 弘

1. はじめに

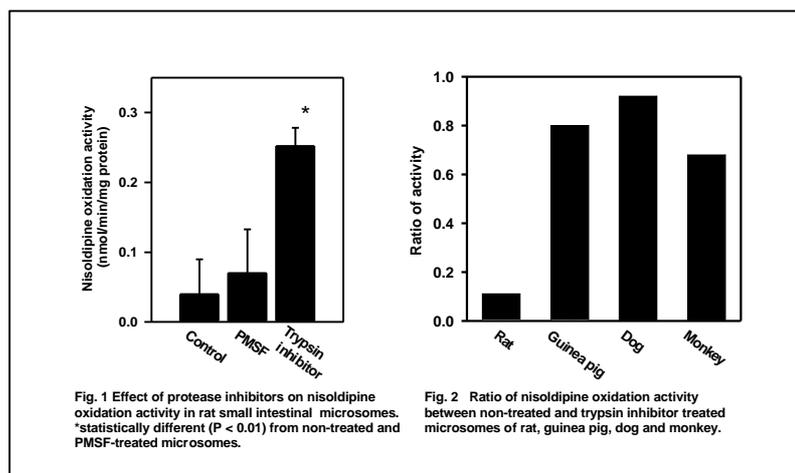
小腸初回通過代謝が cyclosporin A 及び midazolam などの CYP3A で代謝される薬剤の生体内利用率に大きな影響を与えることが報告されている。^{1, 2)} また、CYP3A により代謝される dihydropyridine 系の薬剤では、グレープフルーツジュースにより血漿中濃度が上昇することは誰もが知るところであり、これは小腸の CYP3A 活性がグレープフルーツの成分により阻害されるためである。^{3, 4)} これらのことは、小腸 CYP3A が生体内利用率さらに薬物相互作用に大きく関わっていることを示唆しており、新薬開発を行う上で考慮されるべきリスクファクターの 1 つと言える。ヒト小腸における CYP3A の代謝活性は肝臓と比較して低く、初回通過代謝のメカニズムを明らかにするために、ヒトに近い小腸 CYP3A 代謝活性を有する動物種を用いて検討することが望まれている。しかしながら肝臓での薬物代謝活性の種差に比べ、小腸代謝活性に関する報告は極めて少ないのが現状である。我々は dihydropyridine 誘導体の 1 つであり、グレープフルーツジュースとの薬物相互作用を示す nisoldipine を用いて、⁴⁾ 小腸代謝活性の種差について検討し、その得られた知見を中心に述べることにする。

2. 小腸マイクロソームの調製法

小腸代謝活性を測定する上での大きな問題は、マイクロソームの調製過程で消化管内に存在するプロテアーゼにより P450 が分解されることである。⁵⁾

これまで多くの研究者により種々の阻害剤が使用され、また調製法が検討されてきた。^{6 - 8)} 著者は、nisoldipine の主代謝経路の 1 つである BAY o 3199 生成 (dehydrogenation) 活性を指標として、ラット小腸マイクロソームの調製方法を検討した。

ラット小腸代謝活性は阻害剤として一般によく利用されている phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) よりも trypsin inhibitor を用いて調製したマイクロソームの方が有意に高かった (Fig. 1)。⁵⁾ しかし興味深いことに、trypsin inhibitor の効果はイヌ及びサル



では顕著に認められず (Fig. 2)、同様の傾向は 7-ethoxycoumarin deethylation 活性を指標とした場合でも確認された。またマウスにおいても種々の protease inhibitor を用いて活性が上昇することが報告されており、⁷⁾ これらの結果はげっ歯類からミクロソームを調製する際プロテアーゼなどにより P450 が失活するが、イヌ及びサルでは安定であることを示唆している。

3 . 小腸代謝活性の種差

ラット、モルモット、イヌ及びサルの小腸ミクロソームを用いて、nisoldipine 代謝 (BAY o 3199 及び水酸化体である BAY r 9425 の生成) 活性の種差を検討し、その得られたパラメータを table 1 に示した。ヒト小腸では両代謝反応に関する K_m 値が 1.8-2.3 μM と低く、それぞれの K_m 及び V_{\max} から算出した CL_{int} は 0.27 及び 0.0571 ml/min/mg であった。ラット及びイヌの K_m 値はヒトと比較して高く、特にモルモットでは 31 μM と大きかった。両代謝反応から算出した CL_{int} はラットで 0.0684ml/min/mg, イヌで 0.0991 及びサルで 0.257 となり、ラット及びイヌは低く、サルはヒトに近い値を示した。さらに、サル及びヒト小腸ミクロソームを用いて CYP3A4 の代謝反応である midazolam 1'-hydroxylation 及び testosterone 6 β -hydroxylation 活性を測定した (table 2)。サルにおける midazolam 1'-hydroxylation 活性の K_m 及び V_{\max} は 2.38 μM 及び 0.347 nmol/min/mg、testosterone 6 β -hydroxylation の S_{50} 及び V_{\max} は 63.3 μM 及び 1.44 nmol/min/mg であり、いずれの代謝反応ともヒトとほぼ等しい値を示した。一方マウス及びラットにおける testosterone 6 β -hydroxylation 活性はそれぞれ 0.23⁷⁾及び 0.042 nmol/min/mg⁹⁾であることが報告されている。以上の結果からサルの小腸代謝能がヒトに最も近いものと判断される。

またサル小腸での nisoldipine、midazolam 及び testosterone の代謝活性は肝臓と同様に troleandomycin または ketoconazole で阻害された。Lownらはヒト小腸及び肝臓において同じアミノ酸配列を持つ CYP3A4 が発現している可能性を報告している。¹⁰⁾ 一方ラットにおいては肝と異なった CYP3A isoform の発現が示唆されており、^{11,12)} 今後サルの小腸において肝と同じ isoform が発現しているか詳細な検討が必要である。

Table 1 Kinetic parameters of nisoldipine metabolism in small intestinal microsomes of various species

	BAY o 3199			BAY r 9425		
	K_m (μM)	V_{\max} (nmol/min/mg)	V_{\max}/K_m (ml/min/mg)	K_m (μM)	V_{\max} (nmol/min/mg)	V_{\max}/K_m (ml/min/mg)
Rat	7.47	0.374	0.0513	4.03	0.0541	0.0171
Guinea pig	31.0	0.256	0.0089	33.2	0.103	0.0038
Dog	9.65	0.831	0.0854	5.99	0.0317	0.0057
Monkey	4.05	0.690	0.195	3.31	0.186	0.0617
Human	2.28	0.442	0.270	1.81	0.100	0.0571

Table 2 Kinetic parameters of testosterone 6 β -hydroxylation and midazolam 1'-hydroxylation in small intestinal microsomes of monkey and human

	Testosterone 6 β -hydroxylation			Midazolam 1'-hydroxylation	
	S_{50} (μM)	n	V_{\max} (nmol/min/mg)	K_m (μM)	V_{\max} (nmol/min/mg)
Monkey	63.3	1.7	1.44	2.38	0.347
Human	55.2	2	1.42	4.07	0.382

In vivo における小腸代謝の評価は主にラットを用いて行われているが、先に示したように小腸代謝活性が低いためその初回通過代謝の寄与を十分に評価できない。そこで多くの場合、活性を誘導するため dexamethasone (DEX) が用いられている。¹²⁻¹⁵⁾ 著者は DEX を 80 mg/kg、3 日間経口投与後のラットの nisoldipine 小腸代謝活性を測定した。活性は約 3 倍上昇したものの、ヒトでの活性(CL_{int})と比較して低かった。¹⁶⁾ サルではヒトに近い小腸代謝活性を有しており誘導剤での処理は必要ないこと、またミクロソーム調製時において P450 が比較的安定であることなどから、小腸代謝を検討するのに適した動物種であると考えられる。しかしながら、これまでサルを用いた in vivo での小腸代謝活性の評価はほとんど行われていない。最近開発候補品の絞込みの際サルを用いた動態試験が行われてきており、今後小腸代謝の評価への適応が期待される。

4 . 参考文献

- 1) D. Y. Gomez, V. J. Wachter, S. J. Tomlanovich, M. F. Hebert, L. Z. Benet, Clin. Pharmacol. Ther., 58, 15-19 (1995).
- 2) K. E. Thummel, D. O'Shea, M. F. Paine, D. D. Shen, K. L. Kunze, J. D. Perkins, G. R. Wilkinson, Clin. Pharmacol. Ther., 59, 491-502 (1996).
- 3) M. M. Doherty, W. N. Charman, Clin. Pharmacokinet., 41, 235-253 (2002).
- 4) D. G. Bailey, J. Malcolm, O. Arnold, J. D. Spence, Br. J. Clin. Pharmacol., 46, 101-110 (1998).
- 5) L. S. Kaminsky, M. J. Fasco, Crit. Rev. Toxicol., 21, 407-422 (1991).
- 6) H. Komura, M. Yasuda, N. H. Yoshida, Y. Sugiyama, Drug Metabol. Pharmacokin., 17, 427-436 (2002).
- 7) C. Emoto, H. Yamazaki, S. Yamasaki, N. Shimada, M. Nakajima, T. Yokoi, Xenobiotica, 30, 943-953 (2000).
- 8) K. Mohri, Y. Uesawa, Pharm. Res. 18, 1232-1236 (2001).
- 9) K. Takemoto, H. Yamazaki, Y. Tanaka, M. Nakajima, T. Yokoi, Xenobiotica, 33, 43-55 (2003).
- 10) K. S. Lown, M. Ghosh, P. B. Watkins, Drug Metab. Dispos., 26, 185-187 (1998).
- 11) G. V. Gushchin, M. I. Gushchin, N. Gerber, R. T. Boyd, Biochem. Biophys. Res. Commun., 255, 394-398 (1999).
- 12) S. L. Eeckhoudt, Y. Horsmans, R. K. Verbeeck, Xenobiotica, 32, 975-984 (2002).
- 13) J. H. Lin, M. Chiba, I-W. Chen, J. A. Nishime, F. A. deLuna, M. Yamazaki, Y. J. Lin, Drug Metab. Dispos., 27, 1187-1193 (1999).
- 14) K. Yokogawa, T. Shimada, Y. Higashi, Y. Itoh, T. Masue, J. Ishizaki, M. Asahi, K. Miyamoto, Biochem. Pharmacol., 63, 777-783 (2002).
- 15) R. Yumoto, T. Murakami, M. Sanemasa, R. Nasu, J. Nagai, M. Takano, Drug Metab. Dispos., 29, 145-151 (2001).
- 16) H. Komura, M. Yasuda, N. H. Yoshida, Y. Sugiyama, Xenobio. Metabol. Dispos., 14, S86-S87 (1999).