

生体内 CYP 活性変動の評価

佐野 達哉

(指導教員：川井 恵一教授，小林 正和助教，西 弘大助教)

要旨：代表的な薬物代謝酵素である CYP はその活性や発現量の違いにより薬物治療効果の個体差の要因となっている。我々は CYP の活性定量法の確立を目指す過程で、 ^{123}I -*N*-isopropyl-*p*-iodoamphetamine (^{123}I -IMP) から ^{123}I -*p*-iodoamphetamine (^{123}I -PIA) への代謝変化が CYP2C19 によることを明らかにし、CYP 活性変動を定量するため ^{123}I -IMP の放射性代謝物である ^{123}I -PIA 生成量の変動を評価してきた。本研究では臨床薬剤服用下における CYP 活性変動を評価するために、CYP2C19 の基質である胃酸抑制剤の cimetidine、抗うつ薬の imipramine を CYP の競合阻害剤として使用し、 ^{123}I -PIA 生成量の変化を測定した。マウス肝ホモジネートを用いた *in vitro* 代謝物分析により、cimetidine、imipramine の濃度増加にともなった ^{123}I -PIA 生成量の減少が確認された。また、 ^{123}I -IMP の投与後にマウス体内で生成される ^{123}I -PIA を検出するため、肝、腎をそれぞれ摘出し、ホモジナイズ後に上清を高速液体クロマトグラフィで分析した結果、マウス体内においても薬剤濃度増加とともに ^{123}I -PIA 生成量の減少が確認された。さらに CYP を誘導する抗生物質である rifampicin を前投与したマウスの肝ホモジネートを用いた *in vitro* 代謝物分析、及びマウスを用いた *in vivo* 代謝物分析を同様に行った結果、rifampicin 濃度増加に伴った ^{123}I -PIA 生成量の増加が確認された。本研究より、臨床薬剤服用下における CYP 活性変動を ^{123}I -IMP 代謝物分析によって評価できる可能性が示された。

I. はじめに

動物には cytochrome P450 (CYP) と呼ばれる一連の代謝酵素が存在する。CYP は主に肝臓に存在し、NADPH をエネルギーとして薬物の代謝を行う酵素である。CYP の活性には個人差があり、その個人差により薬効や副作用、複数の薬の間の相互作用などの個体差の要因となっている^{1, 2)}。CYP の活性を定量することができれば、医薬品の投与量を決定する指標の確立につながり、個人に適した投薬が可能になると考えられる。これまでに、我々は局所脳血流診断に用いられる ^{123}I -*N*-isopropyl-*p*-iodoamphetamine (^{123}I -IMP) が CYP の一つである CYP2C19 により特異的に代謝されて ^{123}I -*p*-iodoamphetamine (^{123}I -PIA) に変化することを明らかにし³⁾、さらに ^{123}I -IMP の代謝物である ^{123}I -PIA 生成量を測定することにより、CYP の活性変動を定量できることを提唱してきた。

本研究では、薬剤併用が CYP の活性や発現量に与える影響を検出することを目的とし、広く用いられている薬剤の薬効成分の中で、CYP2C19 の基質であり、 ^{123}I -IMP と競合阻害を起こす胃酸抑制剤から cimetidine、抗うつ薬から imipramine、CYP2C19 を誘導する抗生物質から rifampicin を用いて⁴⁾、CYP 活性変動の定量を行った。

II. 臨床薬剤を用いた代謝阻害実験

II-1-A) マウス肝ホモジネート中の ^{123}I -IMP 生成量変動の測定

マウス肝ホモジネート 20 μL に 0.167 mM EDTA/0.33 M NaK phosphate buffer (pH 7.4) 75 μL , NADPH 生成系 (0.5 mM β -NADP⁺, 5 mM glucose-6-phosphate, 1 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 5 mM MgCl_2) 50 μL , 薬効成分 10 μL (cimetidine : 1, 10, 20, 40, 60, 100 μM /sample, imipramine : 20, 60, 100, 200, 300 μM /sample), 3.7 MBq の ^{123}I -IMP 25 μL を混合し, 反応溶液が 250 μL になるように milli Q を加えた. 薬剤を負荷しない control として薬効成分を milli Q に置き換えたサンプルを用意した. ^{123}I -IMP 添加後, 37 $^\circ\text{C}$ で 60 min インキュベーションした. その後, 反応を停止させるために HClO_4 50 μL , UV 検出の際の内部標準物質として 20 μM *p*-chlorobenzonic acid (PCBA) を 30 μL 添加し, 20 $^\circ\text{C}$, 15000 rpm で 5 min 遠心分離した. 遠心分離後, 上清 35 μL を分取し, 高速液体クロマトグラフィ (high-performance liquid chromatography : HPLC) で分析した. 検出機器には, UV-VIS 検出器 (SPD-10A, Shimadzu), RI 検出器; ラジオアナライザー (RLC-701, Aloka) を使用した. HPLC のカラムには 5C₁₈-AR-II (Nacalai tesque) を用い, 流速 1.0mL/min, 検出波長は UV 232 nm, RI 159 keV \pm 10 %で行った. 移動相は 20 mM potassium phosphate buffer (pH 3.0) : acetonitrile を混合比 60 : 40 で混和して使用した. 得られた分析結果をクロマトグラムデータ解析装置 (Power Chrom, eDAQ) を用いて解析し, ピーク面積を比較した.

II-1-B) 結果と考察

Cimetidine および imipramine 負荷による ^{123}I -PIA 生成量の変化をそれぞれ Fig. 1, Fig. 2 に示す. マウス肝ホモジネートを用いた *in vitro* 実験において, cimetidine, imipramine ともに濃度増加にともなって ^{123}I -PIA 生成量が減少し, 阻害効果が大きくなった.

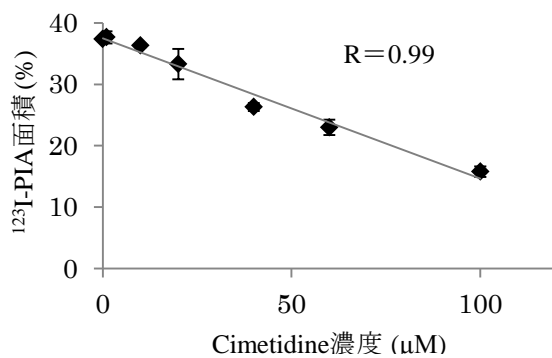


Fig. 1 Cimetidine による ^{123}I -PIA 生成量 (*in vitro*)

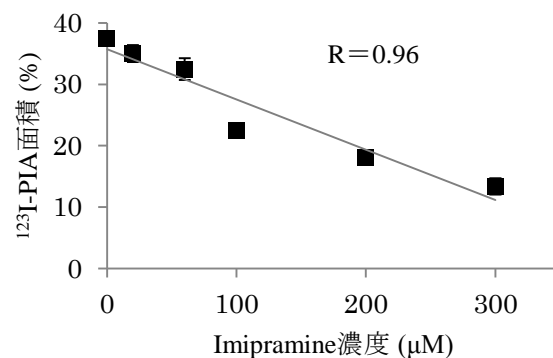


Fig. 2 Imipramine による ^{123}I -PIA 生成量 (*in vitro*)

II-2-A) マウス生体内における ^{123}I -PIA 生成量変動の測定

マウスに 3 μmol あるいは 6 μmol の cimetidine 生理食塩溶液, 4 μmol あるいは 8 μmol の imipramine 生理食塩溶液または薬剤を添加しない生理食塩水各 200 μL を尾静脈注射し, その 3 min 後 ^{123}I -IMP を 1 匹あたり 7.4 MBq/100 μL ずつ投与した. 15 min 後, 肝臓, 腎臓を摘出し, 組織重量の 3 倍量の Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) を添加して, ホモジナイズしたものを 15000 rpm で遠心分離した. 上清 250 μL に, ^{123}I -IMP 及び ^{123}I -PIA の沈殿への吸着を防ぐための ethanol 250 μL と除蛋白のための HClO_4 100 μL , 20 μM PCBA 30 μL を加えよく攪拌し, 再び 15000 rpm で 5 min 間遠心分離した. 遠心分離後, 得られた上清 400 μL を II-1-A と同様の条件で HPLC にて分析した.

II-2-B) 結果と考察

Cimetidine および imipramine による ^{123}I -PIA 生成量の変化をそれぞれ Fig. 3, Fig. 4 に示す。Cimetidine 投与量の増加にともない肝臓, 腎臓に含まれる ^{123}I -PIA 量が有意に減少した。Imipramine 負荷においても, 投与量の増加とともに肝臓中の ^{123}I -PIA 量は有意に減少した。腎臓では有意差はないものの, 減少の傾向が確認された。

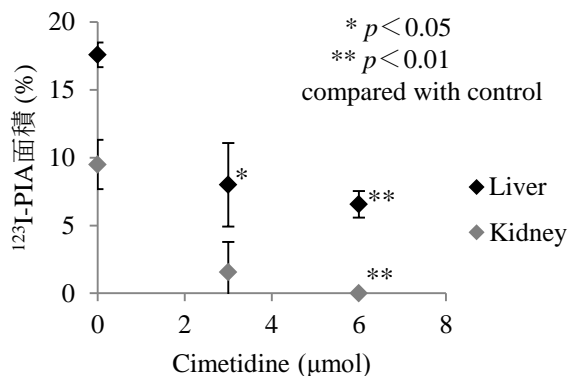


Fig. 3 Cimetidine による ^{123}I -PIA 生成量 (in vivo)

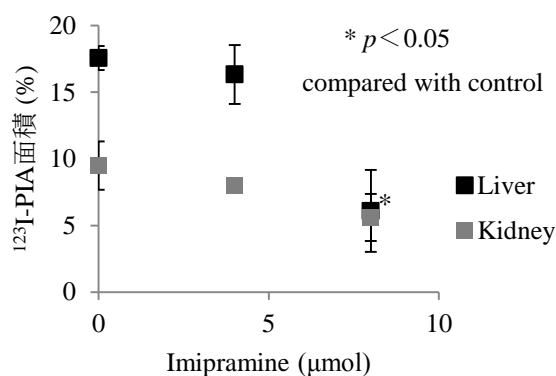


Fig. 4 Imipramine による ^{123}I -PIA 生成量 (in vivo)

III. 臨床薬剤を用いた CYP 誘導実験

IIの結果より, ホモジネートを用いた in vitro 実験及びマウスを用いた in vivo 実験において, CYP 阻害効果を示す薬剤投与による CYP 活性の低下が確認された。そこで, CYP を誘導する薬効成分における代謝物生成量の変動を検証した。

III-1-A) Rifampicin を前投与したマウスの肝ホモジネート中の ^{123}I -PIA 生成量変動の測定

予め 2 nmol または 4 nmol の rifampicin 生理食塩溶液を投与したマウスの肝ホモジネート 20 μL に 0.167 mM EDTA/0.33 M NaK phosphate buffer (pH 7.4) 75 μL , NADPH 生成系 50 μL , 3.7 MBq の ^{123}I -IMP 25 μL を混合し, 反応溶液が 250 μL になるように milli Q を加えた。薬剤を負荷しない control として rifampicin の代わりに生理食塩水を前投与したマウスの肝ホモジネートに置き換えたサンプルを用意した。 ^{123}I -IMP 添加後, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 60 min インキュベーションした。その後, HClO_4 50 μL , 20 μM PCBA を 30 μL 添加し, 20 $^{\circ}\text{C}$, 15000 rpm で 5 min 間遠心分離した。遠心分離後, 得られた上清 35 μL を II-1-A と同様の条件で HPLC にて分析した。

III-1-B) 結果と考察

Rifampicin 負荷による ^{123}I -PIA 生成量の変化を Fig. 5 に示す。Rifampicin 濃度増加にともない ^{123}I -PIA 生成量が有意に増加した。

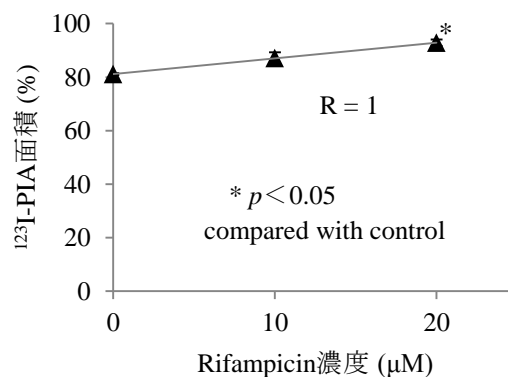


Fig. 5 Rifampicin による ^{123}I -PIA 生成量 (in vitro)

III-2-A) マウス生体内における ^{123}I -PIA 生成量変動の測定

マウスに 2 nmol あるいは 4 nmol の rifampicin 生理食塩溶液または薬剤を加えない生理食塩水各 200 μL を尾静脈注射し, その 3 min 後 ^{123}I -IMP を 1 匹あたり 7.4 MBq/100 μL ずつ投与した. 15 min 後, 肝臓を摘出し, 組織重量の 3 倍量の Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) を添加し, ホモジナイズしたものを 15000 rpm で遠心分離した. 上清 250 μL を分取し, ethanol 250 μL と HClO_4 100 μL , 20 μM PCBA30 μL を加えてよく攪拌し, 再び 15000 rpm で 5 min 間遠心分離した. 得られた上清 400 μL を II-1-A と同様の条件で HPLC にて分析した.

III-2-B) 結果と考察

Rifampicin による ^{123}I -PIA 生成量の変化を Fig. 6 に示す. Rifampicin 投与量増加に伴い ^{123}I -PIA 生成量が有意に増加した.

以上の結果より, ホモジネートを用いた *in vitro* 実験及びマウスを用いた *in vivo* 実験において, CYP 誘導作用を有する薬剤負荷による ^{123}I -PIA 生成量の増加が確認された.

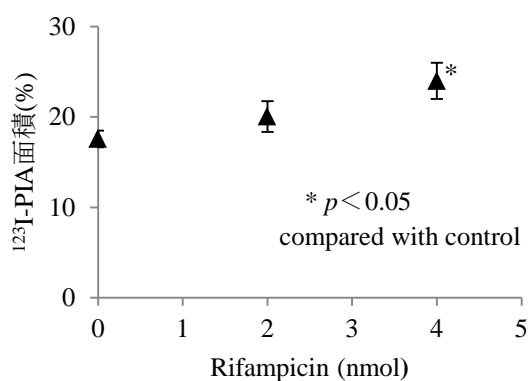


Fig. 6 Rifampicin による ^{123}I -PIA 生成量 (*in vivo*)

IV. 結語

本研究より, 臨床利用されている薬効成分の中でも CYP 阻害効果を示す cimetidine, imipramine, CYP 誘導作用を示す rifampicin が CYP 活性と発現量に及ぼす影響を, ^{123}I -IMP 代謝物分析によって検出された. この結果より, ^{123}I -IMP 代謝物分析が薬剤服用下の個人に適した医薬品の投与量を決定する指標の確立につながる可能性が示された.

V. 謝辞

本研究を終えるにあたり, ご指導いただいた川井恵一教授, 小林正和助教, 西 弘大助教, ご協力いただいた本研究室の方々に心より御礼申し上げます.

VI. 参考文献

- 1) Bibi Z: Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutr Metab* 5: 27, 2008
- 2) Preissner SC, Hoffmann MF, Preisser R, et al: Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy. *PLoS One* 8, e82562, 2013
- 3) Fujita K, Sugiyama M, Akiyama Y, et al: *N*-isopropyl-*p*-iodoamphetamine hydrochloride is predominantly metabolized by CYP2C19. *Drug Metab Dispos* 40: 843-846, 2012
- 4) Flockhart DA: Drug interactions: Cytochrome P450 drug interaction table. Indiana University School of Medicine, 2007