

松浦 貴仁

(指導教員：川井 恵一 教授)

要旨：ヒトに投与された医薬品は薬物代謝酵素によって代謝されるが、複数の薬物を投与した際に、同じ酵素によって代謝される薬物同士の競合阻害によって酵素活性が阻害され、副作用が生じる可能性がある。そのため、薬物代謝酵素の活性を測定し、医薬品の投与量を決定することで、副作用のリスクを低減できると考えられる。そこで本研究では、てんかん焦点の核医学検査に用いられており、投与後肝臓で代謝され、水酸化物と脱エステル体の各放射性代謝物の生成が報告されている ^{123}I -Iomazenil (^{123}I -IMZ) の ^{125}I 標識体を用い、各代謝反応に関与する酵素の特定を試みた。マウス肝ホモジネートを用いて ^{125}I -IMZ の代謝物を分析した結果、水酸化物の生成において NADPH 依存性を確認し、cytochrome P450 (CYP) の関与が判明したため、医薬品の代謝に関わる CYP の主要な 7 分子種の特異的基質を用いて阻害実験を行った。その結果 CYP2B6, 2C19, 3A4 の基質負荷時に代謝反応が阻害され、有意な濃度依存性が確認された。また、加水分解反応を触媒する酵素がカルボキシルエステラーゼであると推定して阻害実験を行った結果、脱エステル体の生成は濃度依存的に阻害された。以上より ^{125}I -IMZ の肝臓での水酸化反応には CYP2B6, 2C19, 3A4 が関与しており、脱エステル体の生成にはカルボキシルエステラーゼが関与していることが特定できた。よって ^{123}I -IMZ の放射性代謝物の解析を行い、これらの薬物代謝酵素活性を非侵襲的に定量できる可能性が示された。

I. はじめに

ヒトに投与された医薬品は薬物代謝酵素によって代謝されるが、その酵素活性には個人差があり、薬効や副作用発現の個体差要因となっている。また、2 つ以上の薬物を投与した場合に競合作用が起きてしまい、代謝されずに体内に薬物が残ることで、副作用のリスクが高くなってしまう危険性がある。そこで、薬物代謝酵素の活性を測定し、個人に最適な処方薬の投与量をオーダーメイドで決定することが副作用の回避には重要であると考えられる。また、薬物代謝酵素活性の測定を基にして医薬品の投与量を決定することは、昨今重要視されている根拠に基づいた医療 (evidence-based medicine ; EBM) の観点からも、薬物療法の個別化において非常に有用である。

当研究室ではこれまで、核医学画像診断薬から生じる放射性代謝物の生成量から薬物代謝酵素活性を評価するため、既に脳血流製剤として臨床利用されている ^{123}I -*N*-isopropyl-*p*-iodoamphetamine (^{123}I -IMP) を用いて、主に肝臓に存在しており、多くの薬物を代謝基質とする cytochrome P450 (CYP) と呼ばれる薬物代謝酵素の活性を評価してきた¹⁾。

本研究では、臨床核医学検査で神経レセプタイメーキング剤として、てんかん焦点の診断に使用されている ^{123}I -Iomazenil (ethyl-5,6-dihydro-7- ^{123}I -iodo-5-methyl-6-oxo-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazepine-3-carboxylate ; ^{123}I -IMZ) が生体内で放射性代謝物に変化するという報告^{2,3)}に着目した。当研究室では ^{123}I -IMZ 投与後の胆嚢及び膀胱への放射性代謝物の集積をダイナミックイメージ

ングで捉えることにより、薬物代謝酵素活性を定量できる可能性を既に確認している。 $^{123}\text{I-IMZ}$ の放射性代謝物には $^{123}\text{I-IMZ}$ の水酸化物、脱エステル体、脱エステル体のグルクロン酸抱合体とあり、それぞれ水酸化酵素、エステラーゼ、グルクロン酸抱合酵素 (UDP-glucuronosyltransferase ; UGT) と呼ばれる薬物代謝酵素によって代謝される (Fig.1) 。そこで $^{123}\text{I-IMZ}$ の放射性代謝物を分析することで、第一相反応酵素である水酸化酵素とエステラーゼの分子種同定を試みた。

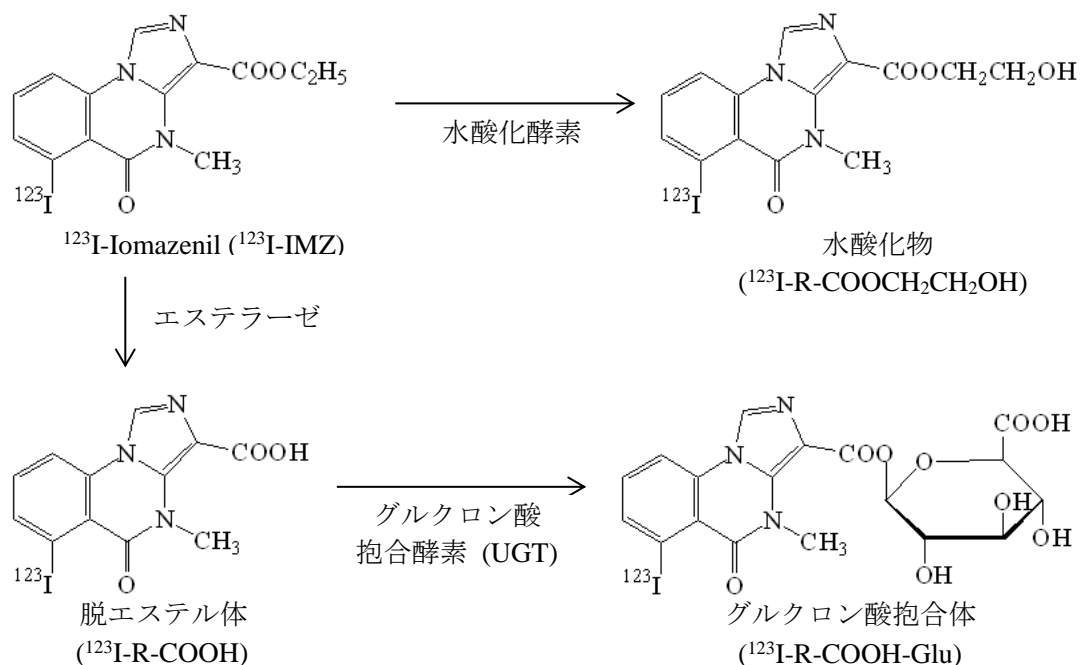


Fig.1 $^{123}\text{I-IMZ}$ の主な代謝経路のフローチャート

II. $^{125}\text{I-IMZ}$ の肝ホモジネート代謝物における CYP 関与

$^{123}\text{I-IMZ}$ が NADPH 依存性を示す CYP で代謝されると仮定し、CYP で代謝されることを確認するために、 ^{125}I 標識体である $^{125}\text{I-IMZ}$ を用いて、マウス肝ホモジネート中に NADPH 生成系を添加時と、非添加時に生成する放射性代謝物を分析し、比較した。

A) 実験材料と方法

マウス肝ホモジネート 10 μL に 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) 37.5 μL 、薬物代謝酵素 CYP のエネルギー源を作り出す NADPH 生成系 (0.5 mM $\beta\text{-NADP}^+$ 4.5 mg, 5.0 mM glucose-6-phosphate 18.2 mg, 1.0 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase 10.72 μL , 5.0 mM MgCl_2 53.6 μL を用時混和した溶液) 25 μL 、108 kBq の $^{125}\text{I-IMZ}$ 2.0 μL を混合し、反応溶液が 125 μL になるように精製水を加えた。活性の発現に NADPH が必要な薬物代謝酵素 CYP により $^{125}\text{I-IMZ}$ が代謝を受けるか否かを確認するため、NADPH 生成系を精製水に置き換えたサンプルを用意した。 $^{125}\text{I-IMZ}$ は日本メジフィジックスより供与されたものを用いた。各サンプルに $^{125}\text{I-IMZ}$ を添加後、37 度で 60 分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エタノール 50 μL を添加し、15000 rpm で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を分取し、クロロホルム：酢酸：精製水 = 65 : 35 : 5 を展開溶媒とするシリカゲル薄層板 (Merck) による薄層クロマトグラフィ (thin-layer chromatography ; TLC) にて分析した。 $^{125}\text{I-IMZ}$ の放射性代謝物である水酸化物、脱エステル体の同定には日本メジフィジックス株式会社中央研究所の Yoshimura らの先行研究の Rf 値を参考にした。

B) 結果と考察

^{125}I -IMZ の肝ホモジネートにおける放射性代謝物の TLC 分析結果を Fig.2 に示す。マウス肝臓内において、 ^{125}I -IMZ の水酸化物の生成は NADPH 生成系を非添加時では検出限界以下となり、CYP が関与していることが確認できた。

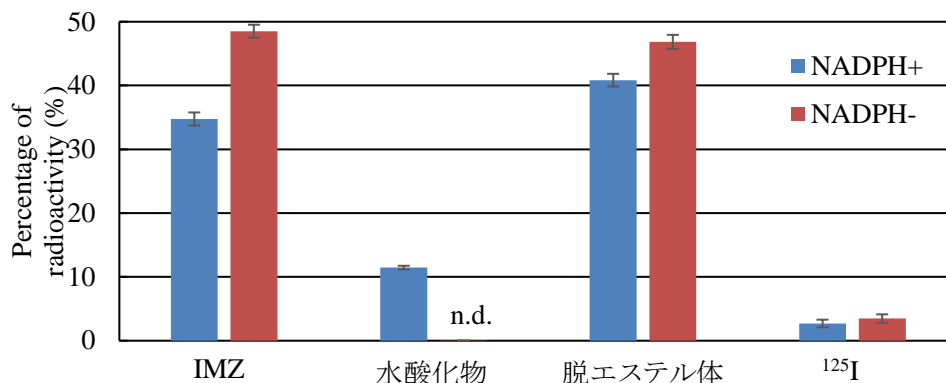


Fig.2 ^{125}I -IMZ の放射性代謝物生成に対する NADPH 依存性

n.d. : not determined

III. ^{125}I -IMZ の肝ホモジネートでの水酸化酵素特定

Fig.3 に使用した阻害剤と医薬品の代謝に占める割合を示す。医薬品代謝の 8 割以上に関与する⁴⁾、7 種類の CYP 分子種を評価の対象として阻害実験を行った。それぞれの CYP 分子種に対する阻害剤を Table.1 に示す。

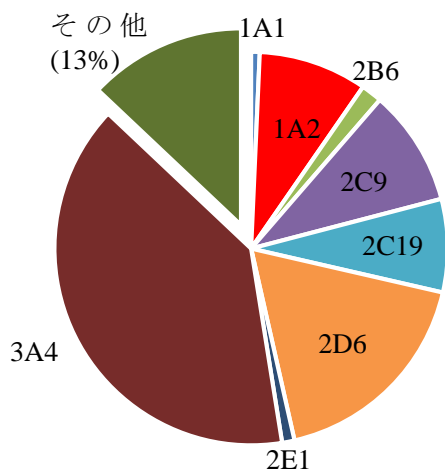


Fig.3 ヒト CYP 分子種の医薬品の代謝に関わる割合

Table.1 使用した阻害剤と阻害する CYP の分子種

CYP 分子種	阻害剤 (メーカー)
1A1/1A2	α -naphthoflavone (Apolo Scientific)
2B6	ticlopidine (和光純薬工業)
2C9	sulfaphenazole (Santa Cruz Biotechnology)
2C19	fluconazole (和光純薬工業)
2D6	quinidine (Sigma-Aldrich)
2E1	4-methylpyrazole (東京化成工業)
3A4	ketoconazole (和光純薬工業)

A) 実験材料と方法

Table 1 に示す各阻害剤を最終濃度が 100 μM になるように調整し、12.5 μL 用意した。マウス肝ホモジネート 10 μL に 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) 37.5 μL 、薬物代謝酵素 CYP のエネルギー源を作り出す NADPH 生成系 (0.5 mM β -NADP⁺ 4.5 mg, 5.0 mM glucose-6-phosphate 18.2 mg, 1.0 U/mL

glucose-6-phosphate dehydrogenase 10.72 μL , 5.0 mM MgCl_2 53.6 μL を用時混和した溶液) 25 μL 、各阻害剤 12.5 μL 、108 kBq の ^{125}I -IMZ 2.0 μL を混合し、反応溶液が 125 μL になるように精製水を加えた。比較対象として NADPH 生成系を精製水に置き換えたサンプルを用意した。 ^{125}I -IMZ は日本メジフィジックスより供与されたものを用いた。各サンプルに ^{125}I -IMZ を添加後、II. と同様の条件にて ^{125}I -IMZ の放射性代謝物を分析した。

B) 結果と考察

CYP 阻害剤負荷時の水酸化物分析結果を Fig.4 に示す。最終濃度を 100 μM にした ticlopidine, fluconazole, ketoconazole 負荷時には水酸化物の生成が有意に阻害されることが確認できた。

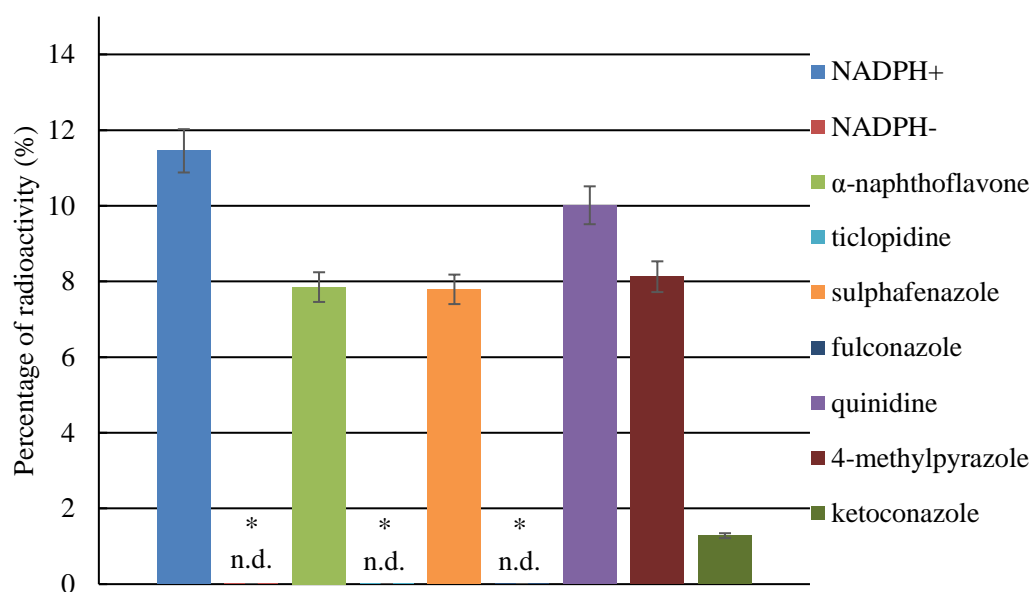


Fig.4 ^{125}I -IMZ 水酸化物生成に対する CYP 阻害剤の影響

* $p < 0.05$ compared with NADPH+

n.d. : not determined

IV. ^{125}I -IMZ の肝ホモジネートにおける放射性代謝物阻害実験の濃度依存性

III. の結果より、有意な阻害が見られた 3 種類の CYP 阻害剤の濃度を変化させて、マウス肝ホモジネートに添加後、生成する放射性代謝物分析を行い、濃度依存性を確認した。

A) 実験材料と方法

Ticlopididine, fulconazole, ketoconazole をそれぞれ最終濃度が 0.1, 1, 10, 100 μM になるように調整し、12.5 μL 用意した。マウス肝ホモジネート 10 μL に 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) 37.5 μL 、薬物代謝酵素 CYP のエネルギー源を作り出す NADPH 生成系 (0.5 mM β -NADP⁺ 4.5 mg, 5.0 mM glucose-6-phosphate 18.2 mg, 1.0 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase 10.72 μL , 5.0 mM MgCl_2 53.6 μL を用時混和した溶液) 25 μL 、各阻害剤 12.5 μL 、108 kBq の ^{125}I -IMZ 2.0 μL を混合し、反応溶液が 125 μL になるように精製水を加えた。 ^{125}I -IMZ は日本メジフィジックスより供与されたものを用

いた。各サンプルに $^{125}\text{I-IMZ}$ を添加後、II. と同様の条件にて $^{125}\text{I-IMZ}$ の放射性代謝物を分析した。

B) 結果と考察

$^{125}\text{I-IMZ}$ の肝ホモジネートにおける放射性代謝物の TLC 分析結果を Fig.5 に示す。各種阻害剤の濃度が高くなるにつれて水酸化物が有意に低下したことから、ticlopidine, fulconazole, ketconazole において $^{125}\text{I-IMZ}$ との濃度依存性が確認できた。以上より、水酸化反応には CYP2B6, 2C19, 3A4 が $^{125}\text{I-IMZ}$ の水酸化反応に関与していることが特定できた。

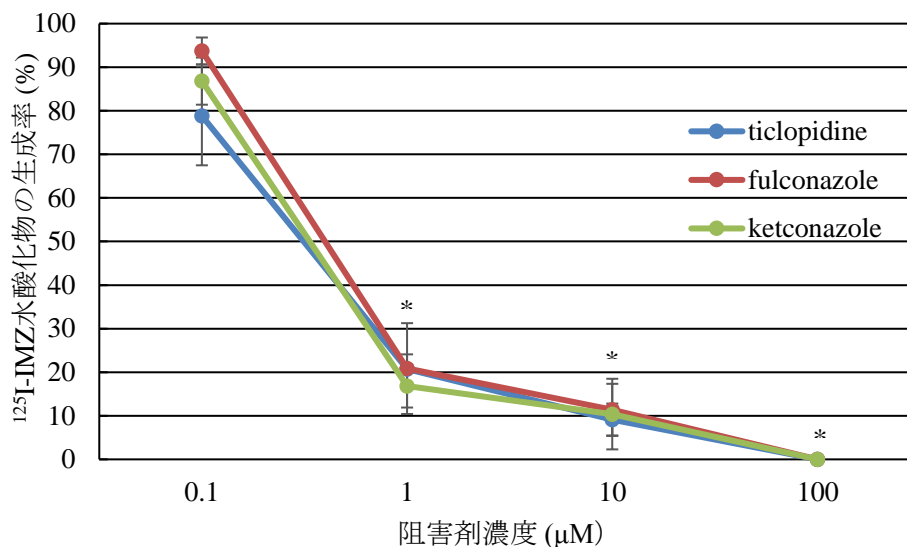


Fig.5 $^{125}\text{I-IMZ}$ の水酸化物生成に対する CYP 阻害剤の濃度依存性

* $p < 0.05$ compared with 0.1 μM

V. $^{125}\text{I-IMZ}$ の肝ホモジネートでの加水分解酵素特定

代表的な加水分解酵素であるカルボキシルエステラーゼに着目し、その特異的阻害剤を用いて、 $^{125}\text{I-IMZ}$ のマウス肝ホモジネート中で生成する脱エステル体に対する阻害効果と阻害剤濃度依存性を検討した。

A) 実験材料と方法

Bis-(4-nitrophenyl)-phosphate (東京化成工業) を最終濃度が 0.1, 1, 10, 100 μM になるように調整し、12.5 μL 用意した。マウス肝ホモジネート 10 μL に 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) 37.5 μL、薬物代謝酵素 CYP のエネルギー源を作り出す NADPH 生成系 (0.5 mM $\beta\text{-NADP}^+$ 4.5 mg, 5.0 mM glucose-6-phosphate 18.2 mg, 1.0 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase 10.72 μL, 5.0 mM MgCl_2 53.6 μL を用時混和した溶液) 25 μL、阻害剤 12.5 μL、108 kBq の $^{125}\text{I-IMZ}$ 2.0 μL を混合し、反応溶液が 125 μL になるように精製水を加えた。各サンプルに $^{125}\text{I-IMZ}$ を添加後、II. と同様の条件にて $^{125}\text{I-IMZ}$ の放射性代謝物を分析した。

B) 結果と考察

最終濃度を 100 μM としたカルボキシルエステラーゼ負荷時における TLC 分析結果を Fig.6 に

示す。マウス肝臓内において、 ^{125}I -IMZ の脱エステル体の生成は、特異的阻害剤を添加時に有意に減少し、脱エステル体に対する阻害効果が確認できた。

^{125}I -IMZ の肝ホモジネートにおける放射性代謝物に対する脱エステル体の割合を Fig.7 に示す。阻害剤の濃度が高くなるにつれて脱エステル体の生成が有意に低下したことから、bis-(4-nitrophenyl)-phosphate が阻害しているカルボキシルエステラーゼが ^{125}I -IMZ の脱エステル体の生成に関与していることが特定できた。

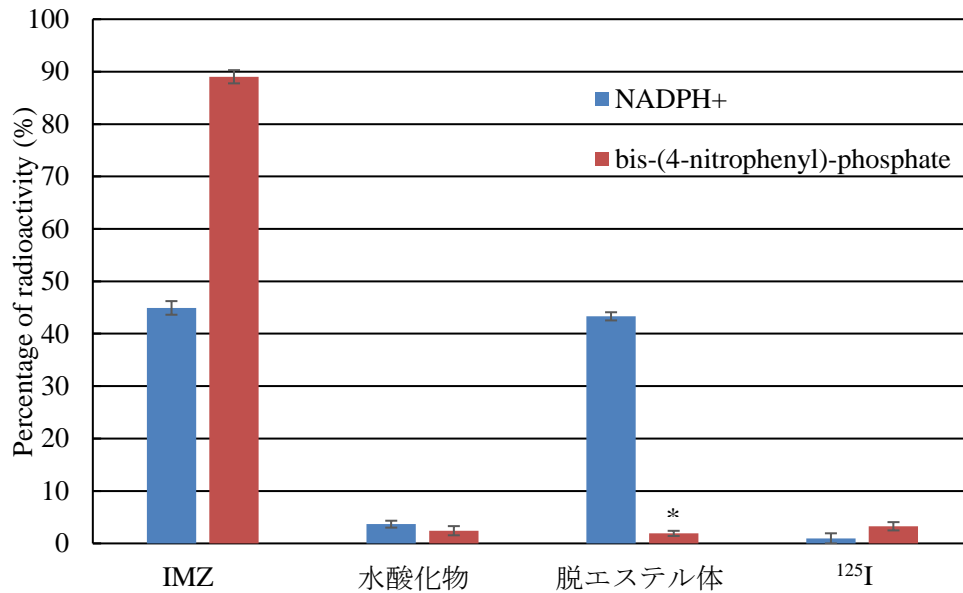


Fig.6 ^{125}I -IMZ 放射性代謝物生成に対するカルボキシルエステラーゼ阻害剤の影響
* $p<0.05$ compared with NADPH+

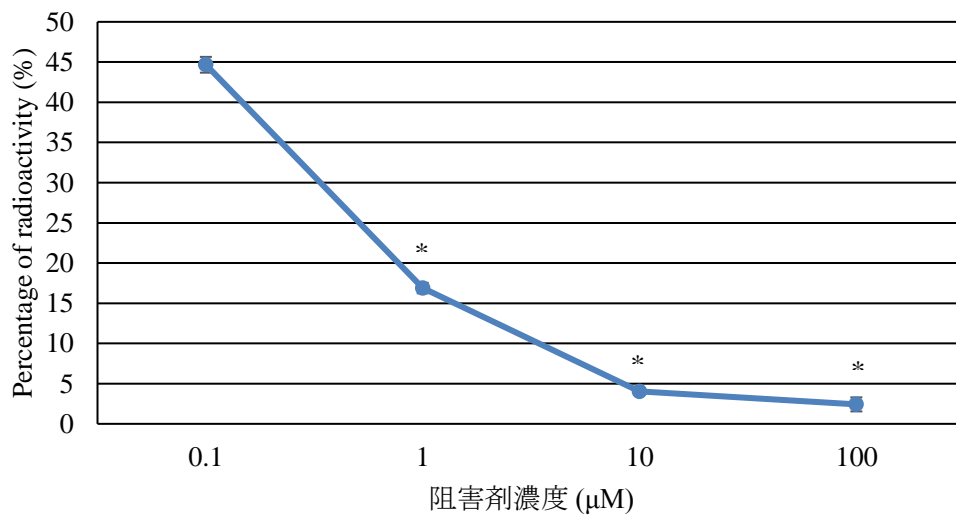


Fig.7 ^{125}I -IMZ の脱エステル体生成に対するカルボキシルエステラーゼ阻害剤の濃度依存性
* $p<0.05$ compared with 0.1 μM

VI. 結語

本研究より、以下の2点が確認された。

(1) ^{125}I -IMZ の水酸化反応には CYP2B6, 2C19, 3A4 が関与している。

(2) ^{125}I -IMZ の脱エステル体の生成にはカルボキシエステラーゼが関与している。

^{123}I -IMZ が肝臓で代謝された後に、胆嚢や膀胱に集積することが確認されていることから、これらの集積をダイナミックイメージングで解析することにより、これらの薬物代謝酵素活性を非侵襲的に定量できる可能性が示された。

VII. 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導くださいました川井恵一教授、健康増進科学センター小林正和助教、ご協力いただいた水谷明日香さん、高須啓彰さんをはじめとする本研究室の方々にご心より御礼申し上げます。また、研究試料として ^{125}I -IMZ をご提供いただきました日本メジフィジックス株式会社に感謝いたします。

VIII. 参考文献

- 1) Nishi K, Mizutani A, Shikano N, Fujita K, Kobayashi M, Ono M, Nishii R, Sasaki Y, Kinuya S, Kawai K : In vivo radioactive metabolite analysis for individualized medicine. a basic study of a new method of CYP activity assay using ^{123}I -IMP. *Nucl Med Biol.*, 42 : 171-176 (2015).
- 2) 吉村 弘一, 柳井 明良, 松本 博樹, 井田 圭子, 倉見 美規, 米倉 義晴, 鳥塚 莞爾 : イオマゼニル (^{123}I) の薬物動態に関する検討. *核医学.*, 32 : 1037-1043 (1995).
- 3) 日本メジフィジックス株式会社 : ベンゾタイン®注. 医薬品インタビューフォーム., (2013).
- 4) 平田 睦子 : 日本の医薬品添付文書における CYP に関する情報の解析研究. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 123 : 12-18 (2005)