

1801 心筋血流製剤 ^{99m}Tc -MIBI のヒト肝マイクロゾーム画分における薬物代謝酵素の同定

桐谷 武明

(指導教員: 川井 恵一 教授、水谷 明日香 助教)

要旨: 一般に生体内に投与された医薬品の多くは薬物代謝酵素により代謝されることから、核医学画像診断薬も生体内で薬物代謝を受けることで分布、動態が変化する可能性がある。心筋血流製剤である ^{99m}Tc -2-hexakis 2-methoxyisobutyl-isonitrile (^{99m}Tc -MIBI) は、生体内で代謝を受けないとされてきた。一方、本研究室ではヒト肝マイクロゾーム (HLMS) 画分において ^{99m}Tc -MIBI の放射性代謝物の生成を確認している。そこで本研究では、 ^{99m}Tc -MIBI の代謝経路を解明するために代表的な薬物代謝酵素の同定を試みた。その結果、HLMS 中に NADPH 生成系を加えることで ^{99m}Tc -MIBI の放射性代謝物が生成されたため、 ^{99m}Tc -MIBI の代謝に薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) の関与が確認できた。更に、医薬品代謝の 9 割以上を占める 6 種類のヒト CYP 分子種に対する阻害剤を負荷した結果、CYP3A4 阻害剤負荷により、 ^{99m}Tc -MIBI の HLMS における放射性代謝物の生成が特異的に抑制されることが確認できた。以上の結果より、HLMS において ^{99m}Tc -MIBI はヒト肝 CYP3A4 によって代謝されることが明確になったことから、その放射性代謝物の排泄経路を特定すると共に生成量を定量評価することで、ヒト肝 CYP3A4 活性を評価できる可能性が示された。

I. はじめに

薬物は生体内で吸収 (absorption), 分布 (distribution), 代謝 (metabolism), 排泄 (excretion) の頭文字から ADME と呼ばれる動態を示す。中でも、薬物代謝は生体にとって異物である医薬品を体外へ排出しやすくする重要な機能である。医薬品の代謝は、生体内の様々な薬物代謝酵素によって進行する。薬物代謝酵素の活性は個人差があり、活性の高低によって代謝反応の程度が変化するため、医薬品を同量投与した場合でもその薬効や副作用の発現は個々人で異なる。よって、患者個々の薬物代謝酵素の活性を定量した上で医薬品の投与量を決定することができれば、薬物療法の個別化における EBM (evidence-based medicine) の観点から非常に有用である。

現在、薬物代謝酵素の欠損や機能低下が遺伝子多型として存在することが知られており、遺伝子検査によって診断することができる。しかし、遺伝子検査によって評価できるのは個人が生来持っている個体差のみであり、薬物代謝酵素活性の個人差は遺伝子多型のみを要因とするものではない。一つの薬物代謝酵素に対してそれを基質とする医薬品は多数存在するため、特定の薬物代謝酵素を基質とする医薬品が同時に 2 種類以上存在した場合、競合して代謝の阻害が起こる。このような多剤併用による薬物相互作用もまた、薬物代謝酵素の活性の個体差要因となり得る。薬物相互作用をはじめとした、食生活、喫煙、飲酒などの環境的な要因も、薬物代謝酵素活性を評価する上で非常に重要な要素である。従って遺伝的、環境的要因の双方の影響により変動した薬物代謝酵素活性を評価できる、より現状を反映した薬物代謝酵素活性の定量手法が必要である。

一般に放射性医薬品は、標的組織における滞留機序としての代謝以外には代謝反応を受けないことを前提に設計されている。心筋血流製剤である ^{99m}Tc -2-hexakis 2-methoxyisobutyl-isonitrile

($^{99m}\text{Tc-MIBI}$) も生体内では分解されず未変化体として腎尿路系及び肝胆道系によって排泄されると考えられている¹⁾。一方、本研究室では $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ における肝胆道系排泄機序の検討を行った際、 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ がヒト肝ミクロゾーム (human liver microsomes: HLMS) 画分に存在する薬物代謝酵素によって代謝されることを確認したが、 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ の薬物代謝経路は未だ解明されていない。 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ がある特定の薬物代謝酵素によって代謝されることが明らかとなれば、その放射性代謝物の生成量を定量することで特定の薬物代謝酵素の活性を評価できると考えられる²⁾。

以上のことから、本研究では $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ のHLMS中での代謝に着目し、薬物代謝酵素の同定を目指した。

II. 実験材料と方法

(A) HLMS 中での $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ 代謝実験

NADPHは薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP)による代謝のエネルギー源となるため、NADPH生成系添加の有無により代謝物のNADPH依存性を判断することで、代謝反応へのCYPの関与を明らかにできる。NADPH生成系の組成を以下に示す。Glucose-6-phosphate (Nacalai tesque) 及び $\beta\text{-NADP}^+$ (Nacalai tesque) を、精製水にそれぞれ 133.3 mM, 12.2 mM となるように溶解した。 MgCl_2 (Nacalai tesque) を 1.0 M に調整した。Glucose-6-phosphate 水溶液 536 μL , $\beta\text{-NADP}^+$ 水溶液 482.4 μL を混合し、1.0 M MgCl_2 53.6 μL 及び glucose-6-phosphate dehydrogenase (Nacalai tesque) 10.72 μL を添加した。混和後は使用まで氷冷した。

$^{99m}\text{Tc-MIBI}$ 代謝実験には、100 mM phosphate buffer (pH 7.4), HLMS (50-donor pool, BD Biosciences), NADPH生成系、精製水をtable 1に示した組成に調整してよく混和し、NADPH生成系を添加したものをNADPH(+)サンプルとした。一方、NADPH生成系を加えず、精製水で置き換えたサンプルを同様に用意し、NADPH(-)サンプルとした。それぞれに 1.5 MBq/10 μL となるように調整した $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ (日本メジフィジックス) を加えた後、37 $^{\circ}\text{C}$ で加温して反応させた。反応時間は、5, 15, 30, 60 min とし、ethanol 50 μL を加えて反応を停止させた。

各サンプルを 15000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min 遠心分離し、その上清を分取した。この上清を total counts が等しくなるように固定相: シリカゲル薄層板 (Silica gel 60 RP-18 F_{254s}, Merck)、移動相: acetonitrile: methanol: 0.5 M ammonium acetate: THF=4: 3: 2: 1 で TLC (thin-layer chromatography) により分析した。また、あらかじめ ethanol を添加して酵素を失活させたサンプルに $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ とその標識原料である $^{99m}\text{TcO}_4^-$ を加え同様に TLC 分析したものを標準として Rf 値を比較した。

Table 1 各サンプルの組成 [μL]

	NADPH(+)	NADPH(-)	阻害実験
100 mM phosphate buffer (pH 7.4)	37.5	37.5	37.5
HLMS (human liver microsomes)	10.0	10.0	10.0
NADPH 生成系	25.0	0	25.0
精製水	42.5	67.5	30.0
阻害剤溶液	0	0	12.5
$^{99m}\text{Tc-MIBI}$	10.0	10.0	10.0
Total volume	125.0	125.0	125.0

(B) HLMS 中での ^{99m}Tc -MIBI 代謝阻害実験

CYP は現在臨床利用されている医薬品の 8 割以上の代謝に関与し、その分子種は 50 種類以上存在する。Fig. 1 に医薬品の代謝に関与する CYP 分子種の割合を示す³⁾。本実験では、数多く存在する CYP 分子種の中でも医薬品代謝の 9 割以上を担う 6 種類 (CYP1A1/2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4/5) の CYP 分子種を対象に評価を行った。本研究で用いた CYP 分子種に対する特異的阻害剤を table 2 に示す。各種阻害剤は最終濃度が 10 μM (dimethyl sulfoxide 0.8% v/v) になるようにそれぞれ調整した^{4,12)}。また、CYP3A4 特異的阻害剤である ketoconazole は最終濃度が 0.1, 1 μM (dimethyl sulfoxide 0.8% v/v) となるように別に調整した。

^{99m}Tc -MIBI 代謝阻害実験には 100 mM phosphate buffer (pH 7.4), HLMS, NADPH 生成系、精製水、阻害剤溶液を table 1 に示した組成に調整してよく混和し、1.5 MBq/10 μL となるように調整した ^{99m}Tc -MIBI を添加した後、37 $^{\circ}\text{C}$ で加温して反応させた。反応時間は 15, 60 min とし、ethanol 50 μL を加えて反応を停止させた。その後、各サンプルを 15000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min 遠心分離し、その上清を分取した。この上清を II (A) と同様の条件で TLC 分析を行った。

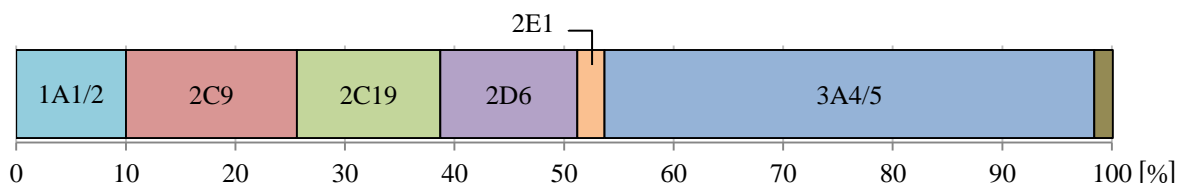


Fig. 1 医薬品の代謝に関わる CYP 分子種割合

Table 2 CYP 分子種に対する特異的阻害剤

CYP 分子種	阻害剤
1A1/2	α -Naphthoflavone (Apolo scientific) ^{4, 5)}
2C9	Sulfaphenazole (Santa cruz biotechnology) ^{5, 6, 7)}
2C19	Fluconazole (富士フィルム和光純薬工業) ^{6, 8)}
2D6	Quinidine (Sigma-aldrich) ^{7, 8, 9, 10)}
2E1	4-Methylpyrazole (東京化成工業) ¹¹⁾
3A4	Ketoconazole (富士フィルム和光純薬工業) ^{7, 11, 12)}

III. 結果と考察

(A) HLMS 中での ^{99m}Tc -MIBI 代謝実験

15, 60 min 反応させた NADPH(+)サンプル及び NADPH(-)サンプルを TLC 分析した結果をそれぞれ Fig. 2 (a), (b) に示す。 ^{99m}Tc -MIBI, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の Rf 値確認のために標準サンプルを展開した結果、Rf 値はそれぞれ 0.25, 0.95 であった。Fig. 2 (a) より、反応後 15 min では Rf 値 0.40-0.50 と 0.60-0.75 に放射性代謝物の画分が確認できた。反応後 60 min では Rf 値 0.60-0.80 に放射性代謝物の画分が確認できた。代謝物のうち、Rf 値が 0.5 付近の画分を M1, 0.7 付近の画分を M2 と呼ぶこととする。また Fig. 2 (b) より、NADPH(-)サンプルでは代謝物 M1, M2 の画分は共に確認できなかった。以上の結果から ^{99m}Tc -MIBI の代謝物生成には NADPH 依存性があるため、 ^{99m}Tc -MIBI の代謝に CYP の関与が確認された。未変化体と代謝物の経時変化を Fig. 3 に示す。一度生成された M1 が 15 min を境に減少するとともに M2 は時間経過に伴い増加することから、 ^{99m}Tc -MIBI の代謝反応が 1 段階目に M1 へと代謝され、2 段階目に M2 へと代謝される直列型であることが推測された。

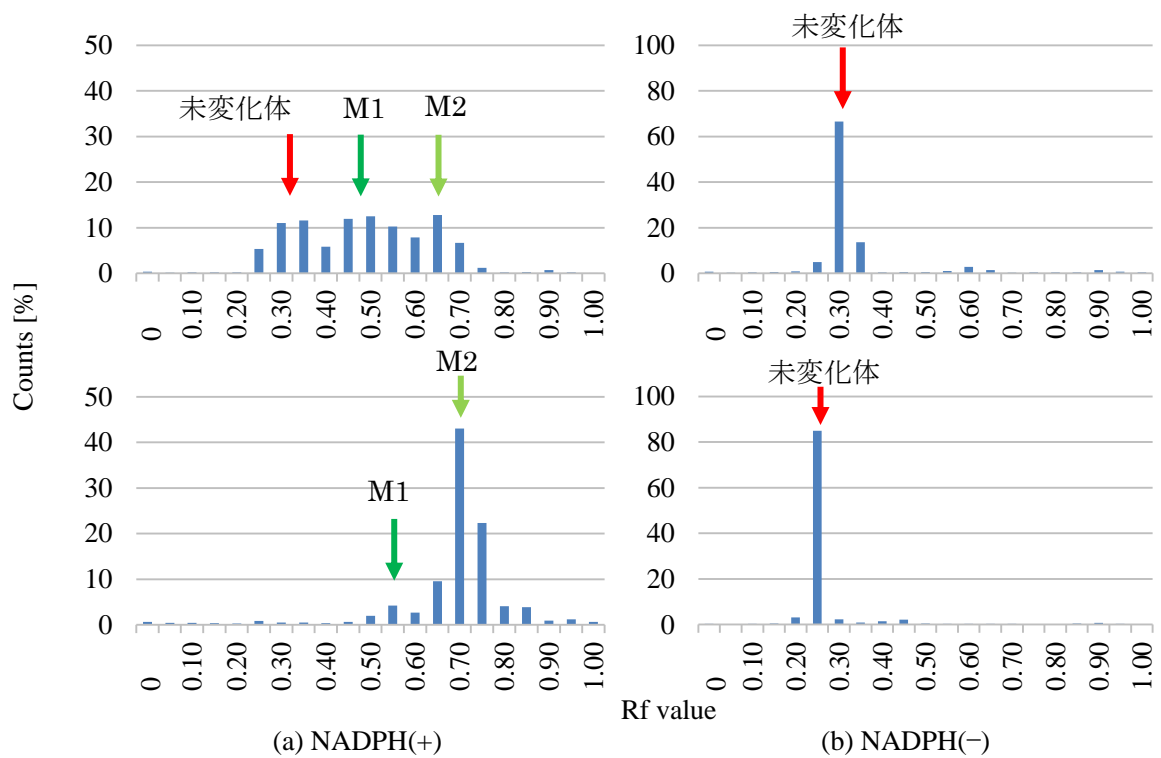


Fig. 2 HLMS 中の ^{99m}Tc -MIBI 放射性代謝物 TLC 分析 (上: 15 min、下: 60 min)

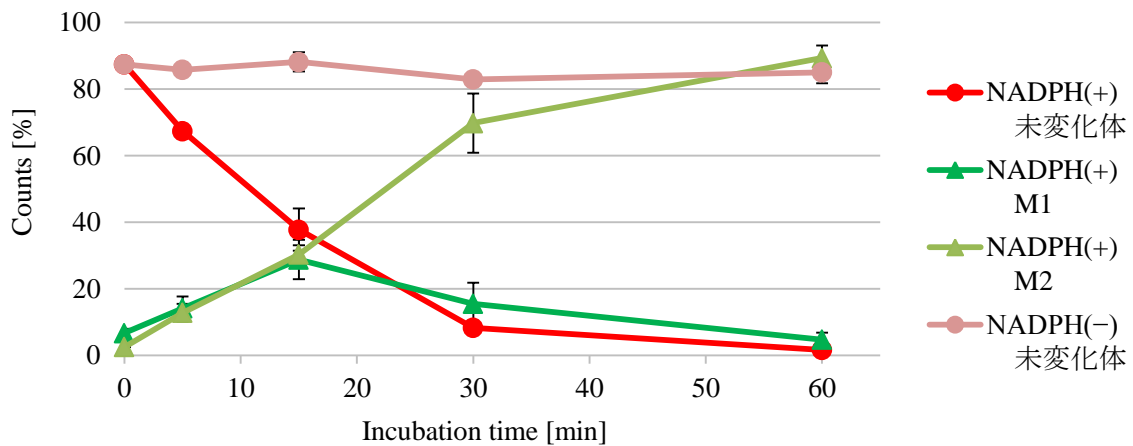


Fig. 3 HLMS 中の ^{99m}Tc -MIBI 放射性代謝物 TLC 分析 (経時変化)

(B) HLMS 中での ^{99m}Tc -MIBI 代謝阻害実験

HLMS を用いた ^{99m}Tc -MIBI 代謝実験における各種阻害剤負荷時の未変化体及び放射性代謝物の生成量の変化を Fig. 4 に示す。NADPH(-), CYP3A4 特異的阻害剤である ketoconazole 負荷の両サンプルにおいて代謝物生成が有意に減少していることが確認できた。更に Fig. 3 で示した代謝物 M1 の生成量が最大となった反応後 15 min においても NADPH(-), ketoconazole 負荷の両サンプルは代謝阻害効果が顕著であった。また反応後 60 min においても NADPH(-), ketoconazole 負荷の両サンプルは非常に顕著な阻害効果が確認できた。従って、直列型であると推測された ^{99m}Tc -MIBI の代謝において、CYP3A4 は代謝第 1 段階の ^{99m}Tc -MIBI から M1 への代謝に関与していることが考えられた。

CYP3A4 特異的阻害剤である ketoconazole 負荷における代謝阻害効果が確認できたため、各負荷濃度における放射性代謝物の生成量の変化を検討した。その結果をFig. 5 に示す。Ketoconazole 負荷濃度の増加に伴って $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ の放射性代謝物生成が減少していることが確認できた。

以上の結果から CYP による代謝を受けた $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ の放射性代謝物は、CYP3A4 の特異的阻害剤である ketoconazole を負荷することで代謝阻害を受けることが明らかとなった。更に、 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ の代謝物の生成量が CYP3A4 活性に依存していることから、 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ の放射性代謝物量を定量することで、ヒト肝 CYP3A4 活性を評価できると考えられた。

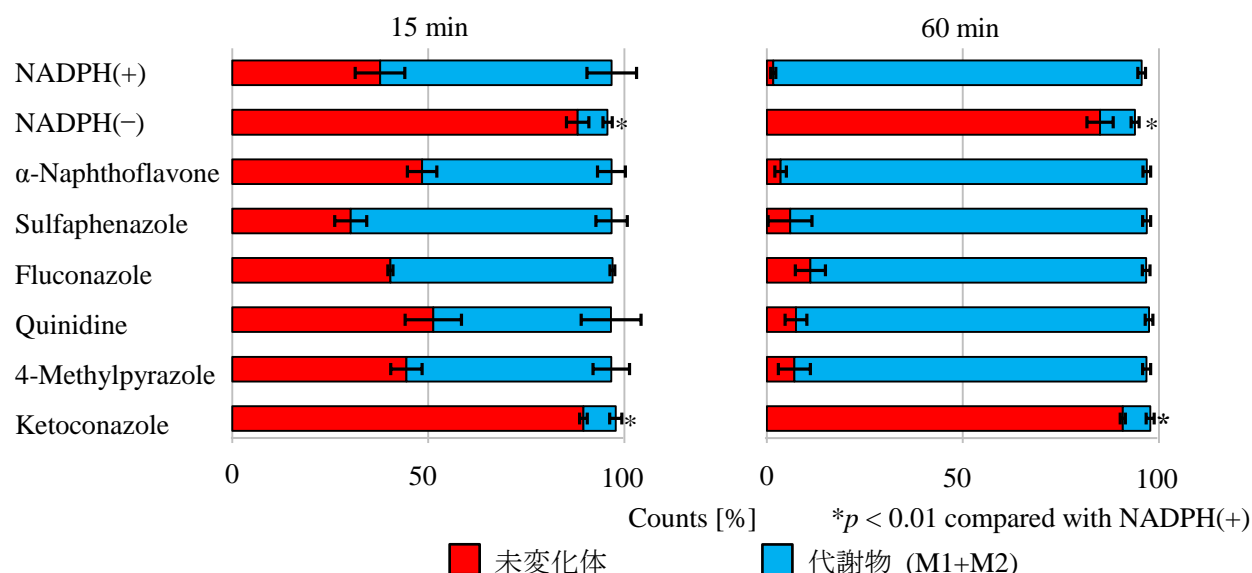


Fig. 4 各種阻害剤負荷による放射性代謝物の生成量変化

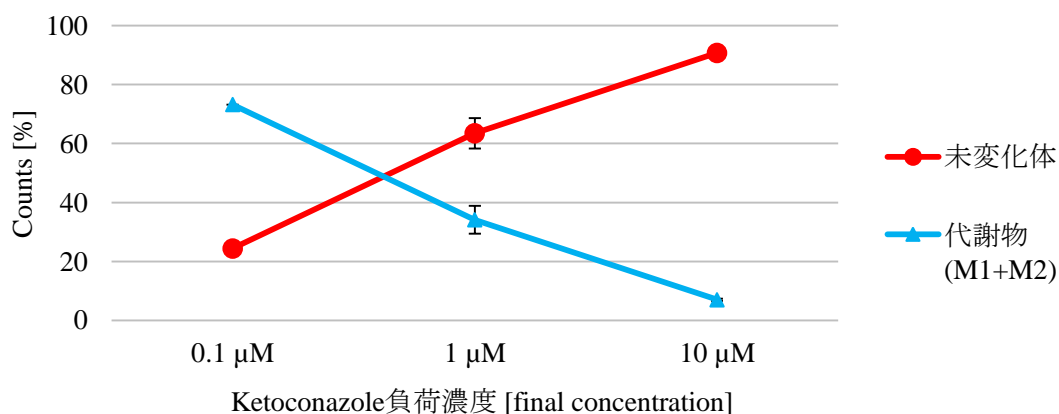


Fig. 5 CYP3A4 特異的阻害剤 ketoconazole 負荷濃度における代謝物の生成量変化

IV. 結語

$^{99m}\text{Tc-MIBI}$ を用いた *in vitro* 代謝物分析の結果、HLMS 中において NADPH 依存性の放射性代謝物の生成が確認されたため、 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ はヒト肝 CYP によって代謝を受けることが明らかとなった。更に代表的なヒト CYP 分子種に対する阻害剤負荷実験を行った結果、CYP3A4 特異的阻害剤である ketoconazole 負荷によって $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ の代謝反応が抑制されたため、HLMS 中での $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ の代謝第 1 反応がヒト肝 CYP3A4 特異的に行われていることが明らかとなった。

従って、 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ における代謝物の排泄経路を確認すると共に、その代謝物生成量を簡便に

定量する手法を確立することで、医薬品代謝のおよそ半数を占める CYP3A4 活性を評価できる可能性が示された。

V. 謝辞

本研究を終えるにあたり、ご指導くださいました川井恵一教授、小林正和助教、水谷明日香助教、ご協力いただきました本研究室の方々に心より感謝申し上げます。

VI. 参考文献

- 1) カーディオライト 第一 添付文書 2018 年 10 月改訂 (第 11 版)
- 2) Nishi K, Mizutani A, Shikano N, et al: In vivo radioactive metabolite analysis for individualized medicine: A basic study of a new method of CYP activity assay using ¹²³I-IMP. Nucl Med Biol 42 (2): 171-176, 2015.
- 3) Williams JA, Hyland R, Jones BC, et al: Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. Drug Metab Dispos 32 (11): 1201-1208, 2004.
- 4) Kim MJ, Kim H, Cha IJ, et al: High-throughput screening of inhibitory potential of nine cytochrome P450 enzymes in vitro using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 19 (18): 2651-2658, 2005.
- 5) Bourrie M, Meunier V, Berger Y, et al: Role of cytochrome P-450 2C9 in irbesartan oxidation by human liver microsomes. Drug Metab Dispos 27 (2): 288-296, 1999.
- 6) Dinger J, Meyer MR, Maurer HH: Development of an in vitro cytochrome P450 cocktail inhibition assay for assessing the inhibition risk of drugs of abuse. Toxicol Lett 230 (1): 28-35, 2014.
- 7) Xu C, Desta Z: In vitro analysis and quantitative prediction of efavirenz inhibition of eight cytochrome P450 (CYP) enzymes: major effects on CYPs 2B6, 2C8, 2C9 and 2C19. Drug Metab Pharmacokinet 28 (4): 362-371, 2013.
- 8) Turpeinen M, Uusitalo J, Jalonen J, et al: Multiple P450 substrates in a single run: rapid and comprehensive in vitro interaction assay. Eur J Pharm Sci 24 (1): 123-132, 2005.
- 9) Zhao XJ, Koyama E, Ishizaki T: An in vitro study on the metabolism and possible drug interactions of rokitamycin, a macrolide antibiotic, using human liver microsomes. Drug Metab Dispos 27 (7): 776-785, 1999.
- 10) Cho DY, Bae SH, Lee JK, et al: Selective inhibition of cytochrome P450 2D6 by Sarpogrelate and its active metabolite, M-1, in human liver microsomes. Drug Metab Dispos 42 (1): 33-39, 2014.
- 11) Wang L, Zhang D, Raghavan N, et al: In vitro assessment of metabolic drug-drug interaction potential of apixaban through cytochrome P450 phenotyping, inhibition, and induction studies. Drug Metab Dispos 38 (3): 448-458, 2010.
- 12) Zhou XW, Ma Z, Geng T, et al: Evaluation of in vitro inhibition and induction of cytochrome P450 activities by hydrolyzed ginkgolides. J Ethnopharmacol 158 (Pt A): 132-139, 2014.