

博士学位論文

新一般用医薬品ジクロフェナクによる
有害事象のリスク評価に関する研究

平成 25 年度

大山 勝宏

目次

略語表

	頁
序論	1
第 I 章 スイッチ OTC 医薬品ジクロフェナクの局所皮膚適用における 副作用発現とリスク因子の評価	
第 1 節 緒言	3
第 2 節 方法	4
I-2-1 調査方法	4
I-2-2 年齢の基準と副作用の分類	4
I-2-3 統計解析	4
I-2-4 倫理的配慮	5
第 3 節 結果	5
I-3-1 対象患者と剤形別副作用	5
I-3-2 副作用の内訳	7
I-3-3 副作用と患者背景	10
I-3-4 局所性の副作用と既往歴	10
I-3-5 全身性副作用とリスク因子	11
第 4 節 考察	17
第 5 節 小括	19
第 II 章 P450 を介するジクロフェナクとその主代謝物が関与する新たな相互 作用の可能性の検討	
第 1 節 緒言	20
第 2 節 実験材料および方法	22
II-2-1 実験材料	22
II-2-2 薬物酸化酵素活性定	22
II-2-3 速度論的解析	23
II-2-4 薬物相互作用の予測	23

II-2-5	ジクロフェナクおよび4'-水酸化ジクロフェナクのヒト P450 酵素に対するドッキングシミュレーション	23
第3節	結果	24
II-3-1	ヒト P450 1A2 および 3A4 によるジクロフェナク水酸化酵素 活性	24
II-3-2	ジクロフェナクのヒト P450 1A2 を介する薬物酸化反応に対 する阻害作用	28
II-3-3	ジクロフェナクおよび4'-水酸化ジクロフェナク共存下での <i>in vivo</i> における AUC 上昇の予測	33
第4節	考察	35
第5節	小括	37
総括		38
本論文内容の誌上発表		40
謝辞		41
参考文献		42

略語表

本論においては以下の略語を用いた。

ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
AUC	Area under the blood concentration time curve
CI	Confidence interval
P450	Cytochrome P450 (EC 1.14.14.1)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Em	Emission
Ex	Excitation
$f_{u,p}$	Plasma unbound fraction
G-6-P	Glucose 6-phosphate
G-6-P DH	Glucose 6-phosphate dehydrogenase
HPLC	High-performance liquid chromatography
[I]	Total concentration of inhibitor
K_i	Inhibition constant
K_m	Michaelis constant
$K_{p,h}$	Liver-plasma concentration ratio
logP	Octanol-water partition coefficient
NADP ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
OR	Odds ratio
OTC	Over-the-counter
P	Water-octanol partition ratio
SD	Standard deviation
UV	Ultraviolet
U value	Total interaction energy
V_{max}	Maximum velocity

序論

平成4年7月の第2次改正医療法にて薬剤師は初めて医療の担い手として明文化され¹⁾、平成18年の第5次改定医療法にて薬局は医療提供施設として認定された²⁾。このような薬剤師および薬局を取り巻く状況の中、平成25年6月に閣議決定された日本再興戦略³⁾のひとつ「予防・健康管理の推進に関する新たな仕組みづくり」の中で、「薬局・薬剤師を活用した健康情報拠点の推進」が謳われ、地域医療において薬局・薬剤師がセルフメディケーションを推し進める役割を担うことが策定された。その背景として2006年度を起点にして、33.1兆円であった医療費は、2025年には自然増加により55兆円にまで増幅することが予想されるが、セルフメディケーション効果により、最小でも9.6兆円、最大で14.4兆円削減する構想がある⁴⁾。その方法のひとつとして、医療用の非処方箋薬を一般用医薬品第1類にスイッチし、市販後調査を経た後にさらに第2類へとシフトしてスイッチOTCを拡大させることで、セルフメディケーションが推進されることを実現しようとするものである⁴⁾。

民間の調査会社による一般用医薬品の国内市場調査によると、外用消炎鎮痛剤は対前年を割り込むことが見込まれているものの、依然として売上高第一位となっており⁵⁾、一般用医薬品の中でのニーズの高さがうかがえる。この外用消炎鎮痛剤のひとつとして、2013年4月に一般用医薬品第1類から第2類へと分類が変更されたジクロフェナク局所皮膚適用製剤がある。NSAIDsであるジクロフェナクはOTC医薬品としてスイッチされた局所皮膚適用製剤、処方箋医薬品として内服薬および坐薬として臨床において幅広く使用されている。ジクロフェナクの有害事象の発現率は30%を超えている⁶⁾。特に重症度の高い心血管障害⁷⁾や脳血管障害⁸⁾などの発現率は他のNSAIDsに比べ最も高いことが指摘されている。しかしながら、ジクロフェナク局所皮膚適用製剤に関しては、他のNSAIDs含有局所皮膚適用製剤に比して、薬剤の全身循環に起因する有害事象を示唆する記載が添付文書になく^{9,10)}、安全性調査が必ずしも十分ではない可能性がある。加えて、本剤は典型的なP450 2C9の基質であるため、チトクロムP450（以下P450）2C9を介した多くの医薬品との薬物相互作用が知られてい

る¹¹⁾。一方、P450 2C9 以外のヒト P450 分子種のジクロフェナクの体内からの消失における正確な役割と他剤の薬物相互作用は必ずしも十分検討されていない。局所皮膚適用製剤といえども、他剤で主成分の全身循環に起因する有害事象が報告されており、使用法あるいは患者の特性によっては内服薬と同等な全身暴露量に達するため、直接的にあるいは併用薬との薬物相互作用によって有害事象が起こる可能性がある。このような背景からスイッチ OTC 化された医薬品の有害事象の発現リスクを評価し、適切な対処によってその発現および重篤化を回避することは、適切な OTC 薬を用いたセルフメディケーションの遂行に繋がることが期待される。

そこで本研究では、一般用医薬品ジクロフェナク局所皮膚適用製剤が引き起こす有害事象のリスク評価を、医療用医薬品ジクロフェナク局所皮膚適用製剤を使用する患者の大規模データベースの調査研究および *in vitro* における薬物相互作用を解明する実験科学研究により検討することを目的とした。第 I 章においては、医療機関からの処方薬およびその患者背景についてデータベースを活用してジクロフェナク局所皮膚適用製剤の使用実態に関する調査研究を行った。第 II 章では、第 I 章で得られたジクロフェナク有害事象成因の詳細について、ヒト P450 2C9 以外の P450 分子種を介した薬物酸化酵素活性に対するジクロフェナクと主代謝物である 4'-水酸化ジクロフェナクの阻害作用を *in vitro* で検討し、臨床においてジクロフェナクが引き起こす薬物相互作用の可能性を追求した。本研究では、これら大規模データベースの調査研究と薬物相互作用を解明する実験研究を統合し、ジクロフェナクのリスク因子を総合的に評価した。この有害事象評価方法により、スイッチ OTC 医薬品の潜在的な有害事象のリスクを管理する上で有用な知見を得たので以下に詳述する。

第 I 章

スイッチ OTC 医薬品ジクロフェナクの局所皮膚適用における副作用発現とリスク因子の評価

第 1 節 緒言

非ステロイド性消炎鎮痛剤は、処方箋薬として広く医師から処方されるだけでなく、OTC 医薬品としても容易に入手、使用される。NSAIDs は、種々の患者背景を鑑み、全身性の作用を期待する内服薬、坐薬などに代わって、局所皮膚適用製剤としてパップ剤、テープ剤、軟膏、クリーム、ローション剤など多岐に渡る剤形により処方される。この局所皮膚適用製剤は、急性期、慢性期共にその局所効果が期待でき¹²⁾、全身性の副作用の発現が低いという利点を有している^{13,14)}。一方で局所皮膚適用製剤は、接触性皮膚炎¹⁵⁾や光過敏症^{16,17)}等の局所性副作用のみならず、アスピリン喘息¹⁸⁾や急性腎不全¹⁹⁾、胎児動脈管収縮²⁰⁾等の全身性副作用の報告もある。

代表的な NSAIDs のひとつであるジクロフェナクは、すべての剤形における重篤な副作用発現率は1%未満であるが、副作用全体としては30%に見られる⁶⁾。中でもジクロフェナクの心血管障害の発現リスクは他の NSAIDs に比べて最も高く⁷⁾、脳血管障害の発現リスクも Rofecoxib（本邦未発売、米国で 2004 年販売中止）に次いで高いことが報告されている⁸⁾。医療用医薬品として発売されたジクロフェナクを成分とする局所皮膚適用製剤は 3 剤形の先発品が上市されている。しかしながら、2000 年のゲル剤以降に発売されたテープ剤、ローション剤に関しては、ジェネリック医薬品と同等との評価を受けて承認を得ているためその副作用発現頻度は不明である。さらにジクロフェナクの添付文書には、他の NSAIDs の記載とは異なり、医薬品の全身循環に起因すると思われる副作用に関する記載はない。スイッチ OTC として上市されたジクロフェナク局所皮膚適用製剤による副作用の発現リスクを評価し、適切な対処によってその発現および重篤化を回避することは、適切な OTC 薬を用いたセルフメディケーションの遂行につながることを期待される。

そこで本研究では、ジクロフェナク局所皮膚適用製剤の副作用発現の実態とそのリスク因子を明らかにすることを目的とし、薬局での患者情報を活用したケースコントロールスタディーを実施した。

第2節 方法

I-2-1 調査方法

2013年9月現在、日本調剤株式会社の全国466店舗に薬歴のある患者の中から、ボルタレン局所皮膚適用製剤（ゲル、テープ、ローション）の使用歴のある患者を抽出し、その中から、患者情報の副作用歴の欄にボルタレンおよび局所皮膚適用製剤のキーワード（シップ、テープ、ゲル、塗り薬等）が含まれている患者を抽出し、1患者を症例1例とした。アレルギー歴の有無や既往歴も同時に個々の患者情報から収集し、具体的な疾患の特定や併用薬等に関しては、患者情報の併用薬欄および直接薬歴を参照した。処方箋発行元の医療機関は、大学病院やクリニックなど多岐に渡っており、診療科は限定せずに調査を行った。

I-2-2 年齢の基準と副作用の分類

年齢は、副作用歴の最終確認日を基準とした。また副作用の記載内容は、患者から聞き取った内容をそのまま、もしくは服薬指導を担当した薬剤師が医学・薬学的用語に換言して記録したものであり、1症状を副作用1件とした。副作用の分類はボルタレン錠25mg¹¹⁾ およびボルタレンゲル1%・ボルタレンローション1%⁹⁾ のインタビューフォームを基に行った。年齢層別の副作用発現率は、各年齢層における副作用発現件数を各年齢層における全ジクロフェナク局所皮膚適用製剤使用患者数で除することで算出した。

I-2-3 統計解析

ジクロフェナク局所皮膚適用製剤の副作用発現頻度に関し、副作用発現者群と非発現者群に分類し、高齢者（65歳以上）および非高齢者、性別、アレルギー

一の有無により 2 群に分け、二変量解析 (χ^2 検定) を行い比較した。次に、副作用を引き起こす要因を探索するため、患者背景の基本的情報である年齢 (± 1 歳) および性別でマッチングを行い、ケース症例 1 例に対してコントロール症例 2 例を無作為に抽出した。独立変数には、局所性の副作用発現に関しては副作用発現者 (561 症例) の各既往歴およびアレルギー歴の有無を、全身性の副作用発現に関しては、各既往歴の有無および全身性の作用を有する併用薬数を用いて、多変量ロジスティック回帰分析によりオッズ比を算出した。併用薬数の算出では、種々の薬剤が薬物相互作用等を介して副作用を引き起こす可能性を考慮し、すべて同じ 1 剤として取り扱った。算出するオッズ比は年齢および性別で調整した。さらに、併用薬を調査して、各薬物の主な生体消失経路に着目し、代謝・排泄別に分類し^{21, 22)}、一覧とした。各検定における有意水準は 5% とし、統計学的有意差を $p < 0.05$ とし、解析は Stat View (Ver. 5 for Windows) を使用した。

I-2-4 倫理的配慮

本研究は、日本調剤株式会社の倫理委員会の承認を得て、得られたデータはデータベースから抽出する際に個人名を除外するなど個人情報の保護に留意し解析を行った。

第 3 節 結果

I-3-1 対象患者と剤形別副作用

抽出された対象患者の概要を Table 1 に示す。総数はのべ 145,478 例 (男/女 : 57,693/87,785 例) で、平均年齢は 59.5 ± 20.7 歳であった。原因となった薬剤の剤形や具体的な副作用の内容が不明であったものを除いて得られた副作用の件数は 595 件であり、その内訳は、ジクロフェナク含有テープ剤 428 件 (発現率 1.09%)、同ゲル剤 160 件 (同 0.16%)、同ローション剤 7 件 (同 0.19%) であった。ジクロフェナク含有テープ剤の副作用発現率が他剤形に比べて 5.7 - 6.8 倍高かった (Table 1)。年齢層別の副作用発現率もすべての年齢層においてジクロ

フェナク含有テープ剤が最も高かった (Fig. 1)。

Table 1. Background of patients included in the study and the type of topical diclofenac formulation used.

	Gel	Tape	Lotion	Total
No. of patients	102,636	39,127	3,715	145,478
Male	39,646	16,705	1,342	57,693
Female	62,990	22,422	2,373	87,785
Age (years, mean \pm SD)	60.1 \pm 20.1	57.4 \pm 20.7	60.1 \pm 20.1	59.5 \pm 20.7
Median age (years)	64	61	63	63
No. of patients with adverse effects	151	422	7	580
Topical	144	410	7	561
Systemic	7	12	0	19
No. of adverse effects	160	428	7	595
Incidence of adverse effects (%)	0.16	1.09	0.19	0.41

I-3-2 副作用の内訳

副作用 595 件 (580 症例) のうち全身性は 20 件 (19 症例) であった (Table 2)。その内訳は、喘息や咳などの呼吸器系のものが 12 件と半数以上を占めたが、その他、浮腫や尿量の減少、薬疹などの内服薬でのみ報告されているものも認められた。局所性の副作用は、接触性皮膚炎や湿疹などの皮膚炎が最も多く、全体の 81.8% を占めた (Table 2)。ついで掻痒感が 7.1%、刺激感が 2.3% を占め、総じて皮膚疾患が全体の 96.3% と大半を占めた。

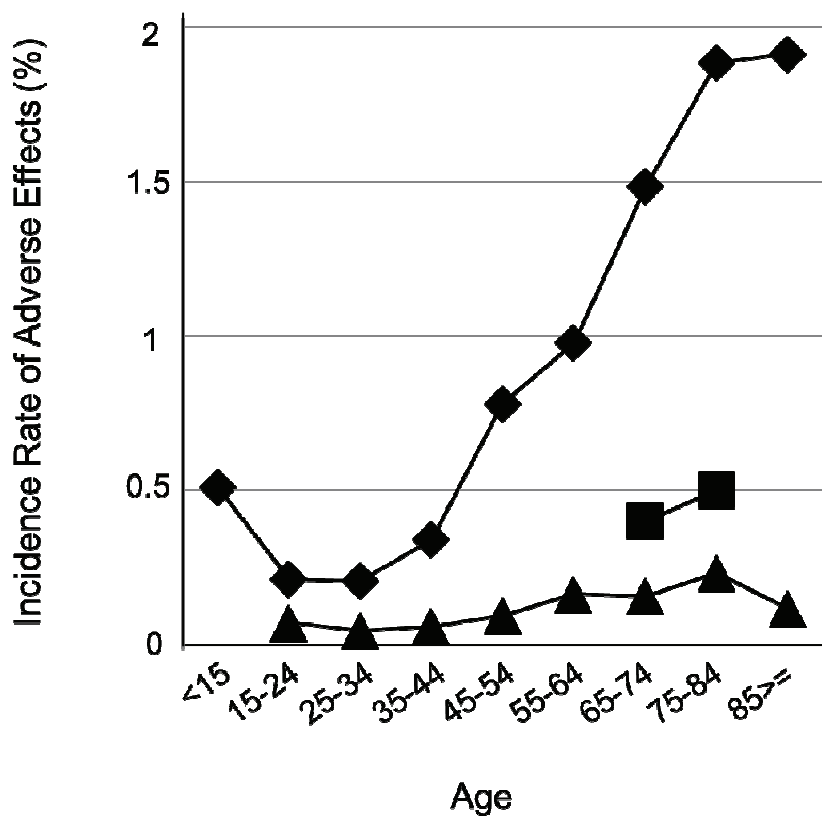


Fig. 1. Incidence of adverse effects by topical formulations of diclofenac in each age bracket.

Tape (◆), gel (▲), and lotion (■) formulations.

Table 2. Types of adverse effects recorded in the study.

Classification	Types of adverse effect	Detail	No. of adverse effects	Ratio
Systemic adverse effect				
Respiratory system				
	Asthma		8	1.3%
		Asthma	4	
		Induced asthma	1	
		Cough	3	
	Feeling of dyspnea		3	0.5%
		Feeling of dyspnea	2	
		Difficulty in breathing	1	
	Stridor		1	0.2%
			12	2.0%
Others				
	Chill		1	0.2%
	Edema		1	0.2%
	Edema of the face		1	0.2%
	Decrease in urinary volume		1	0.2%
	Tremor		1	0.2%
	Dizziness		1	0.2%
	Drug rash		1	0.2%
	Uricatia		1	0.2%
			8	1.3%
Subtotal			20	3.4%
Topical adverse effect				
Dermal system				
	Dermatitis		486	81.8%
		Contact dermatitis	445	
		Eczema	16	
		Flare	15	
		Rash	9	

Table 2 (Continued). Types of adverse effects recorded in the study.

Classification	Types of adverse effect	Detail	No. of adverse effects	Ratio
		Red spots	1	
	Itching		41	7.1%
	Feeling of stimulation		14	2.3%
		Chapping	5	
		Dryness	3	
	Blister		7	1.2%
		Blister	3	
		Pimples	4	
	Hypersensitivity		4	0.7%
		Photosensitization	3	
		Hypersensitivity	1	
	Pigmentation		3	0.5%
		Darkening of the skin	2	
		Parachroma	1	
	Peeled skin		3	0.5%
	Swelling of disease		3	0.5%
	Pain of the affected part		3	0.3%
	Subcutaneous bleeding		1	0.2%
			573	96.3%
	Others			
	Stiffness		2	0.3%
			2	0.3%
	Subtotal		575	96.6%
Total			595	100%

I-3-3 副作用と患者背景

65歳以上の高齢者（67.9%、 $p < 0.0001$ ）と女性（70.3%、 $p < 0.0001$ ）でジクロフェナク局所皮膚適用製剤の副作用発現は有意に高値を示した。一方、アレルギー歴の有無は、ジクロフェナク局所皮膚適用製剤の副作用発現に対し有意な差は認められなかった（Table 3）。

Table 3. Variate analysis of relationship between patient background and incidence of adverse effects from topical formulation of diclofenac.

Variables		Cases (<i>n</i> = 595)		Patients studied (<i>n</i> = 144,883)		<i>p</i> value
		No.	%	No.	%	
Age (years)	65 >=	402	67.6	68,670	47.4	$p < 0.0001^*$
	64 <	193	32.4	76,213	52.6	
Sex	Female	418	70.3	87,367	60.3	$p < 0.0001^*$
	Male	177	29.7	57,516	39.7	
History of allergy	Yes	123	20.7	32,219	22.2	0.386
	No	472	79.3	112,664	77.8	

* $p < 0.05$

I-3-4 局所性の副作用と既往歴

ジクロフェナク局所皮膚適用製剤の局所性副作用に関与するリスク因子は、解析したロジスティック回帰分析の結果では、脂質異常症で関連性が高い傾向はあったものの、どの疾患も統計的に有意と認められなかった（Table 4）。

Table 4. Logistic regression analysis of relationship between medical history and incidence of topical adverse effects from topical formulations of diclofenac.

Risk factor	Cases (<i>n</i> = 561)	Controls (<i>n</i> = 1,122)	OR	95% CI	<i>p</i> value
History of allergy	115	194	1.18	0.91 – 1.54	0.200
Asthma	17	41	0.80	0.45 – 1.42	0.448
Allergic rhinitis	13	30	0.81	0.42 – 1.57	0.534
Atopic dermatitis	1	6	0.32	0.04 – 2.69	0.296
Rheumatoid arthritis	16	23	1.37	0.72 – 2.62	0.340
Systemic lupus erythematosus	2	6	0.61	0.12 – 3.05	0.550
Sjögren's syndrome	2	3	1.27	0.21 – 7.63	0.798
Hypertension	111	195	1.17	0.89 – 1.52	0.257
Diabetes mellitus	41	96	0.86	0.59 – 1.26	0.435
Hyperlipidemia	44	61	1.41	0.94 – 2.11	0.096
Angina pectoris	12	16	1.48	0.69 – 3.17	0.310
Myocardial infarction	6	8	1.48	0.51 – 4.30	0.475
Cerebral infarction	22	30	1.58	0.90 – 2.78	0.115

Adjusted by age and sex.

I-3-5 全身性副作用とリスク因子

全身性副作用を発現したケース群 19 症例の患者背景を Table 5 に示す。このうち、併用薬数が不明なため解析不可能な 2 症例を除き、既往歴および併用薬数を独立変数としてロジスティック回帰分析を行った。その結果、喘息（オッズ比: 13.3、95%、信頼区間: 2.40 – 95.5）および併用薬数（オッズ比: 1.25、95%、信頼区間: 1.02 – 1.55）がジクロフェナク局所皮膚適用製剤のリスク因子として認められた（Table 6）。さらに、副作用発現例各症例の併用薬を各薬剤の主な代謝・排泄別に分類したところ、ジクロフェナクの主代謝酵素である P450 2C9 以外の P450 分子種が代謝消失に関与する医薬品の併用が認められた（Table 7）。

Table 5. Background of patients with systemic adverse effects from topical formulations of diclofenac.

Sex	Age (years)	Adverse effect	Medical history	No. of co-administered drugs
F	14	Feeling of dyspnea	None	0
M	25	Feeling of dyspnea	Childhood asthma, Pneumothorax	3
F	39	Difficulty in breathing	Asthma, Diabetes mellitus, Peptic ulcer, Retinal detachment	11
F	41	Drug rash	Hypothyroidism, Glaucoma	1
M	50	Edema of the face	Hypertension	unknown
F	50	Tremor	None	unknown
F	51	Asthma	Asthma, Allergic rhinitis	3
F	58	Asthma, Chill	Asthma	3
F	58	Asthma	Asthma	2
F	60	Cough	Pneumonia, Liver cancer, Fibroid, Cataract, Ankle fracture	5
F	68	Asthma	Asthma, Hyperthyroidism	10
M	69	Uricatua	Cerebral infarction	4
F	74	Dizziness	Dementia, Cataract, Glaucoma	5
M	82	Decrease in urinary volume	Rheumatoid, Lung emphysema, Lung cancer	5
F	84	Induced asthma	Asthma	6
M	86	Cough	Chronic bronchitis, Lung emphysema, Prostatic hyperplasia, Intestinal bleeding	13

Table 5 (Continued). Background of patients with systemic adverse effects from topical formulations of diclofenac.

Sex	Age (years)	Adverse effect	Medical history	No. of co-administered drugs
M	89	Edema	Arrhythmia, Cataract	9
F	90	Cough	Myasthenia gravis, Spinal stenosis	4
F	92	Stridor	Hypertension, Reflux esophagitis	3

Table 6. Logistic regression analysis of risk factors for systemic adverse effects from topical formulations of diclofenac.

Risk factor	Cases (<i>n</i> = 17) No., mean ± SD	Controls (<i>n</i> = 34) No., mean ± SD	OR	95% CI	<i>p</i> value
Asthma	7	2	13.3	2.40 – 95.5	0.004*
Hypertension	1	5	0.36	0.03 – 3.74	0.391
Diabetes mellitus	1	4	0.50	0.05 – 5.13	0.556
Rheumatoid arthritis	1	1	1.94	0.11 – 33.9	0.650
Arrhythmia	1	1	2.02	0.11 – 37.5	0.637
Cataract	3	2	3.73	0.54 – 25.9	0.184
Glaucoma	1	1	1.98	0.11 – 35.6	0.643
No. of co-administered systemic drugs	5.1 ± 3.6	3.2 ± 3.5	1.25	1.02 – 1.55	0.035*

Two cases which could not confirm the number of co-administered drugs were excluded from this analysis.

**p* < 0.05

Adjusted by age and sex.

Table 7. Classification of drugs co-administered with topical formulations of diclofenac in patients with systemic adverse effects.

Classification in terms of drug metabolism	No. of co-administered systemic drugs			
	Cases (<i>n</i> = 17)		Controls (<i>n</i> = 34)	
	No.		No.	
P450 1A2	2	Theophylline, Tizanidine	0	None
P450 2C8	3	Montelukast (3)	0	None
P450 2C9	5	Glimepiride, Celecoxib, Candesartan, Etodolac, Meloxicam	9	Glimepiride (2), Warfarin (2), Candesartan (2), Valsartan, Celecoxib, Meloxicam
P450 2C19	4	Lansoprazole, Omeprazole, Rabeprazole, Ticlopidine	4	Lansoprazole, Esomeprazole, Rabeprazole, Ticlopidine
P450 2D6	1	Loratadine	4	Chlorpheniramine, Metoprolol, Risperidone, Urapidil
P450 3A4	12	Etizolam (2), Amlodipine (2), Prednisolone (2), Tandospirone, Norethisterone, Clotiazepam, Benidipine, Donepezil, Ethyl Loflazepate	21	Etizolam (3), Diltiazem (2), Brotizolam (2), Amlodipine (2), Diazepam (2), Nifedipine, Benidipine, Bicalutamide, Lafutidine, Tolterodine, Quetiapine, Clotiazepam, Flunitrazepam, Mosapride, Zonisamide
Conjugation	6	Sennoside A•B (3), Ranitidine,	15	Aspirin (3), Furosemide (3),

Table 7 (Continued). Classification of drugs co-administered with topical formulations of diclofenac in patients with systemic adverse effects.

Classification in terms of drug metabolism	No. of co-administered systemic drugs			
	Cases (<i>n</i> = 17)		Controls (<i>n</i> = 34)	
	No.		No.	
		Tamsulosin, Ursodeoxycholic acid		Sennoside A • B (2), Acetaminophen, Ezetimibe, Fenofibrate, Telmisartan, Spironolactone, Naftopidil, Dihydrocodeine
Renal excretion	16	Methotrexate (2), Famotidine (2), Mecobalamin (2), Ascorbic Acid (2), Pregabalin, Olopatadine, Bepotastine, Metformin, Benfotiamine, Pyridoxine, Cyanocobalamin, Carteolol	19	Pravastatin (4), Digoxin (2), Famotidine (2), Metformin (2), Levocetirizine, Memantine, Methotrexate, Olopatadine, Fexofenadine, Benfotiamine, Pyridoxine, Cimetidine, Cyanocobalamin
Others	5	Limaprost (2), Glutathione, Rosuvastatin, Tulobuterol	8	Limaprost (2), Arotinolol, Epalrestat, Olmesartan, Pitavastatin, Temocapril, Tulobuterol

These medicines were classified according to Guengerich and Rendic ²¹⁾ and Rendic and Guengerich ²²⁾.

Two cases which could not confirm the number of co-administered drugs were excluded from this analysis.

第4節 考察

本研究では、薬局での患者情報を活用し、ジクロフェナク皮膚適用製剤における副作用の発現状況とそれに関するリスク因子を調査した。調査結果を総括すると、ジクロフェナク含有テープ剤の副作用発現率が他剤形に比べて5.7–6.8倍程度高く (Table 1)、局所性副作用の発現率が65歳以上の高齢者、および女性で有意に多かった (Table 3)。テープ剤は他剤形に比べて、貼付部位が密封されることや汗、粘着剤などに起因する局所性の副作用発現が多い傾向にあることは知られているが、ジクロフェナク皮膚適用製剤の使用予定者には副作用の可能性および対処方法の伝達、場合によっては剤形変更を提唱すべきと推察された。本剤医療用薬インタビューフォームによると開発時の1%ジクロフェナクナトリウムゲルを用いた臨床試験第Ⅱ相および第Ⅲ相試験では、高齢者 (65歳以上) と非高齢者 (65歳未満) の副作用の発現率はそれぞれ4.2ないし5.4%と年齢差を認めていない⁹⁾。本研究では薬局での患者情報を活用し、ジクロフェナク皮膚適用製剤を利用した多種多様な患者を対象として解析したことで、管理下にある治験参加者とは異なり、一般患者ではその年齢がリスク因子となったことが推察される。

ジクロフェナク局所皮膚適用製剤は、重症誘発喘息発作を起こす恐れがあることから、「アスピリン喘息又はその既往歴のある患者」には禁忌となっている^{9,10)}。また、「気管支喘息のある患者」には慎重投与となっているのは、成人喘息の約10%をアスピリン喘息患者が占める²³⁾ためとされる。今回本研究における全身性の副作用発現者には、アスピリン喘息患者は認められなかったが、喘息が全身性副作用のリスク因子となったことから、改めて喘息の既往歴を有する患者には本剤の適用については十分注意をする必要がある。

別のNSAIDsであるケトプロフェンを成分とする局所皮膚適用製剤においては、アスピリン喘息¹⁸⁾や急性腎不全¹⁹⁾、胎児動脈管収縮²⁰⁾などが報告され、ロキソプロフェンを成分とする局所皮膚適用製剤においては、胃不快感等の消化器症状や、ALT、AST上昇等の臨床検査値異常が添付文書に記載されている²⁴⁾。今回の調査研究結果から、ジクロフェナク局所皮膚適用製剤においても、

現行の添付文書等には記載されていない全身性の副作用も生じることが明らかとなった。

局所皮膚適用製剤における全身性副作用発現の要因は複数推定できる。第一に、個人差による薬剤の全身暴露量の相違である。本剤のインタビューフォームによると、1%ジクロフェナクナトリウムゲルの高齢者における AUC は、成人の AUC の約 5 倍となっている⁹⁾。その最大血中濃度が約 2 倍に、半減期が 5 倍に延長するなどの薬物動態的パラメータの変化から、特に薬物代謝能の低下が示唆され、同じ投与量でも全身暴露量が高齢者と健常人で異なることが原因と考えられる。また、P450 遺伝子多型による薬物代謝能の差も挙げられる。ジクロフェナクの代謝を主に担うチトクロム P450 2C9 の変異型である CYP2C9*3 ホモ接合体の *in vitro* におけるクリアランス (V_{\max}/K_m) は、野性型である CYP2C9*1 ホモ接合体に比べて 10 分の 1 であることが報告されている²⁵⁾。さらに、米国 FDA 推奨の 1 日最大使用量の半量から 1.5 倍量のジクロフェナク局所皮膚適用剤の全身暴露量は、内服常用量 (150 mg/日) のそれと比べ 5 – 17 倍程度低かったとされている²⁶⁾。これらのことから、局所皮膚適用製剤といえども個人差により内服薬と同等の全身暴露量になる可能性がある。

第二に、同時に利用される内服薬との併用による相互作用が考えられる。本研究により、全身性副作用の発現者は非発現者に比して併用薬数が多いことが明らかとなったが、その医薬品名を精査すると、チトクロム P450 分子種の基質となる医薬品が多数を占めていた。従来、ジクロフェナクは添付文書上、P450 2C9 が関わる多くの薬物との相互作用が注意喚起されているが、それ以外の P450 分子種を基質とする薬物との薬物相互作用を起こす可能性も推察された。一般に併用薬数が増えると相互作用のリスクが高まる²⁷⁾ という報告と本研究結果を考え合わせると、併用薬が多数処方されている高齢者患者では、ジクロフェナクの特性を考慮して全身性副作用発現に留意する必要がある。

第5節 小括

ジクロフェナク含有局所皮膚適用テープ製剤は高齢者女性に適応する場合に副作用が発現する可能性をケースコントロールスタディーから見出した。ジクロフェナク局所適応時の全身性副作用発現は、喘息の既往歴を持ち、併用薬数が比較的多い患者に副作用リスクが上昇することが明らかとなった。

第Ⅱ章

P450 を介するジクロフェナクとその主代謝物が関与する新たな相互作用の可能性の検討

第1節 緒言

多くの薬物相互作用は一般的に酵素の阻害や酵素誘導などの薬物代謝の変化に起因する²⁸⁾。医療用として広く処方され、OTC薬としても販売されている非ステロイド系解熱鎮痛消炎剤であるジクロフェナクの臨床における関心が高まってきた。本剤は、骨関節炎、関節リウマチ、強直性脊椎炎や筋肉痛の治療に使用される²⁹⁾。しかしながら、ジクロフェナクの副作用は全処方の約30%であり、そのうち重篤なものは1%以下である⁶⁾。

ヒトにおいて、ジクロフェナクは主にチトクロム P450 2C9 により 4–6 μM の低い K_m 値で 4'-水酸化ジクロフェナクに (Fig. 2)、一部 P450 3A4 により 5-水酸化ジクロフェナクに代謝されることが報告されている^{30,31,32)}。加えて、ジクロフェナクの代謝物としてヒトでは 3'-水酸化ジクロフェナク、4',5-水酸化ジクロフェナク、4'-水酸化ジクロフェナクも挙げられる^{33,34)}。さらに、ジクロフェナクはグルクロン酸抱合も受ける³⁵⁾。ジクロフェナクの反応中間体キノンイミンとジクロフェナクのアシルグルクロン酸体は、ジクロフェナク-タンパク付加物の形成に関連しているという報告がある^{31,36,37)}。ジクロフェナクは典型的な P450 2C9 の基質であるため、他の P450 分子種のジクロフェナクの体内からの消失における正確な役割と P450 2C9 以外のヒト P450 分子種が関与するジクロフェナクと他剤の薬物相互作用は十分検討されていない。

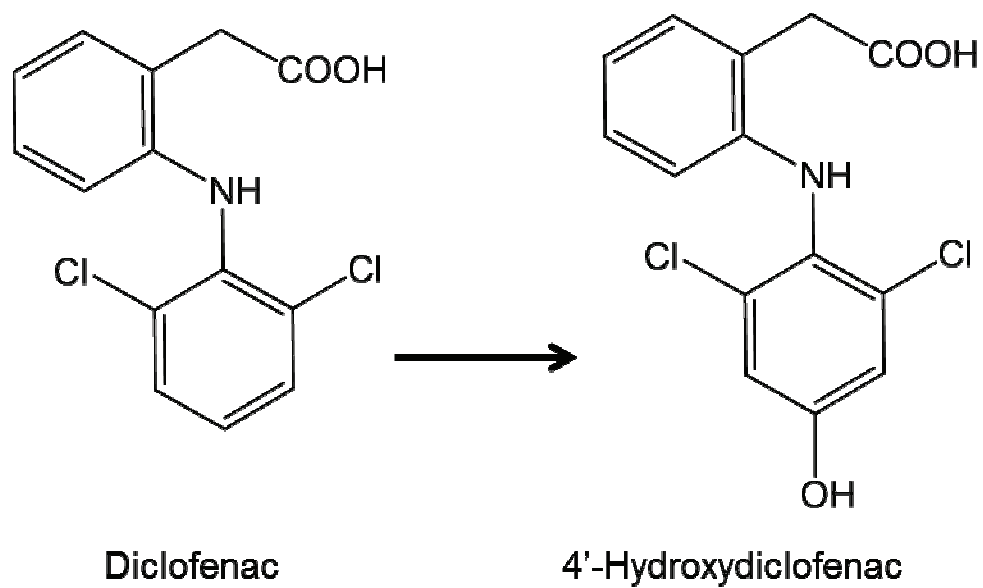


Fig. 2. Structures of diclofenac and its main metabolite, 4'-hydroxydiclofenac.

そこで本研究では、ヒト P450 2C9 以外の P450 分子種を介した酵素活性に対するジクロフェナクと主代謝物である 4'-水酸化ジクロフェナクの阻害作用を検討し、ジクロフェナクによって引き起こされる薬物相互作用の可能性を評価することを目的とした。本章では、ジクロフェナクと主代謝物である 4'-水酸化ジクロフェナクによる P450 2C9 の阻害作用に加え、ヒト P450 1A2 を介したリルゾール、テオフィリン、およびカフェイン代謝に対する阻害作用を明らかにした。

第2節 実験材料および方法

II-2-1 実験材料

ジクロフェナク、4'-水酸化ジクロフェナクは Sigma-Aldrich Japan より、リルゾールは Toronto Research Chemicals より購入した。プールドヒト肝ミクロゾーム (H150) は BD Gentest より購入した。NADPH-P450 還元酵素を共発現した組換え体大腸菌膜画分チトクロム P450 1A2、2C9、2C19、および 3A4 は当研究室で作成した³⁸⁾。本研究で使用したその他の化合物および試薬は既報のとおり^{38, 39)} および市販品の最高純度のものを使用した。

II-2-2 薬物酸化酵素活性の測定

Sanderink ら⁴⁰⁾の方法を一部改変し、リルゾール *N*-水酸化酵素活性は以下の方法に測定した。すなわち、反応系は肝ミクロゾーム (2.0 mg/mL) または大腸菌発現系ヒト各 P450 分子種 (0.025 μ M)、15 μ M 基質および NADPH 生成系 (0.5 mM NADP⁺、5 mM G-6-P、0.5 unit/mL G-6-P DH) を 0.1 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む混液 (計 0.20 mL) とした。混液は特記しない場合は、水浴上 37°C で 0、10、20 分間反応させた。プレインキュベーション依存的な阻害実験においては、P450 酵素と NADPH 生成系は 200 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む混液中 37°C で 20 分間、特記しない場合は 50 μ M のジクロフェナクと 4'-水酸化ジクロフェナクの共存および非共存下でプレインキュベーションした。基質を添加後、反応液は 37°C で 20 分間反応させた。反応は 60% 過塩素酸 (0.01 mL) を添加し、停止させた。ボルテックスによる混合の後、反応後の溶液は 900 g で 10 分間遠心分離した。HPLC システムは、島津製作所製の SCL-10A_{vp} system controller、SIL-10AF auto sampler および CTO-10AS_{vp} column oven を使用した。カラムは Mightysil RP-18 GP Aqua (150 \times 4.6 mm; 5 μ m、関東化学)、Mightysil RP-18 GP (150 \times 4.6 mm; 5 μ m、関東化学) を使用した。反応液は SPD-10A UV detector (島津製作所) を用いて波長は 265 nm で測定した。移動相には 55% メタノール/0.5% リン酸溶液 (v/v) を流速 1.0 mL/min で使用した。カラム温度は 35°C とした。リルゾール *N*-水酸化酵素活性の測定は、リルゾ

ールを標準物質として測定した。

P450 1A2 活性に関する 7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化酵素活性 (基質濃度 5 μM)⁴¹⁾、カフェインおよびテオフィリンの酸化反応 (500 μM)⁴²⁾、P450 2C9 活性に対するジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性 (100 μM) およびフルルビプロフェン 4'-水酸化酵素活性 (100 μM)²⁵⁾、P450 2C19 活性に対する *S*-メフェトニン 4'-水酸化酵素活性 (200 μM)⁴³⁾、および P450 3A4 活性に対するミダゾラム 1'-水酸化酵素活性⁴⁴⁾ は既報のとおり実施した。

II-2-3 速度論的解析

ヒト肝ミクロゾームおよび大腸菌発現系ヒト P450 分子種を用いてジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性の速度論的解析を行った。ジクロフェナク濃度は 5 – 200 μM とした。 K_m 値および V_{max} 値の算出は Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA) を用いて、非線形最小二乗法により求めた。

II-2-4 薬物相互作用の予測

反応が単一の酵素で進行し他の薬物により競合的または非競合的に阻害されるとき、基質濃度が K_m よりもはるかに低いとすると、血漿 AUC 比の変化率は $1+[I]/K_i$ と表される⁴⁵⁾。血漿中非結合型分率 ($f_{u,p}$) 値とオクタノール-水分配係数 (LogP) は *in silico* で SimCYP および ChemDraw BioUltrasoftware を用いて、ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクの肝-血漿濃度比 ($K_{p,h}$) 値は $f_{u,p}$ 値および LogP を用いて下記の式から予測した⁴⁶⁾。

$$K_{p,h} = (0.02289 \cdot P + 0.72621) / (0.00396 \cdot P + 0.960581) \times (f_{u,p} + 1) / 2$$

P は水-オクタノール分配率 [コンピュータで計算した中性下での LogP (c LogP) から算出] である。ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクの LogP 値は、それぞれ 4.72 と 4.05 と算出されたため、ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクの $K_{p,h}$ 値はそれぞれ 2.98、2.88 と算出された。

II-2-5 ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクのヒト P450 酵素に対するドッキングシミュレーション

P450 1A2 の結晶構造 (Protein Data Bank code 2HI4) および 2C9 (1R9O) が最近報告され、シミュレーションに利用されている。ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクのヒト P450 酵素に対するドッキングシミュレーションは、MOE ソフトウェア (ver. 2011.10 Computing Group, Montreal, Canada)³⁹⁾ の MMFF94x 力場を用いて行った。それぞれのシミュレーションには 50 通り想定され、相互作用エネルギー (U 値) に従って順位づけられた。

第 3 節 結果

II-3-1 ヒト P450 1A2 および 3A4 によるジクロフェナク水酸化酵素活性

ジクロフェナク 4'-水酸化反応は主に P450 2C9 によって触媒されるが、本研究では、ヒト P450 1A2 および 3A4 によるジクロフェナク酸化反応の可能性も検討した。ジクロフェナク酸化反応の速度論的解析は、NADPH-P450 還元酵素共発現した大腸菌発現系ヒト P450 1A2、2C9 および 3A4 酵素を用いて行った (Table 8)

Table 8. Kinetic parameters for diclofenac 4'-hydroxylation mediated by recombinant human P450 2C9, 1A2, and 3A4 enzymes.

P450	Diclofenac 4'-hydroxylation		
	K_m (μM)	V_{\max} (min^{-1})	V_{\max}/K_m ($\text{min}^{-1}/\mu\text{M}$)
2C9	4 ± 2	2.42 ± 0.14	0.626
1A2	33 ± 9	0.20 ± 0.02	0.006
3A4	187 ± 28	0.45 ± 0.03	0.002

Kinetic parameters for diclofenac hydroxylation at substrate concentrations from 5.0 to 500 μM were calculated by non-linear regression analysis and are represented as mean \pm SE values for recombinant human P450 2C9, 1A2, and 3A4 (0.10 μM equivalent) expressed in bacterial membranes.

予想したとおり、P450 2C9 で 2.42/min の高い V_{\max} 値と低い K_m 値が得られた。P450 1A2 もまた K_m 値 33 μM 、 V_{\max} 値 0.20/min でジクロフェナク 4'-水酸化反応を触媒した。P450 1A2 の V_{\max}/K_m 値 0.006 $\text{min}^{-1}/\mu\text{M}$ に対し、P450 3A4 も V_{\max}/K_m 値 0.002 $\text{min}^{-1}/\mu\text{M}$ で触媒した。これらの結果、 K_m 値が P450 2C9 に次いで低値であることから、ヒト P450 1A2 は第二のジクロフェナク水酸化反応を触媒する酵素の役割を担う可能性があることを示唆している。

ジクロフェナクは P450 2C9 の阻害剤であることが知られている²⁵⁾。組換え体ヒト P450 2C9 が触媒するフルルビプロフェン 4'-水酸化酵素活性（他の P450 2C9 依存酸化反応である²⁵⁾）に対して、ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクはコントロール活性をそれぞれ 80%および 10%阻害した（Fig. 3）。しかしながら、NADPH 共存下 20 分間プレインキュベーションすることで、この阻害作用は減弱した（Fig. 3）。この条件下では、主代謝物 4'-水酸化ジクロフェナクの阻害作用は消失していった。

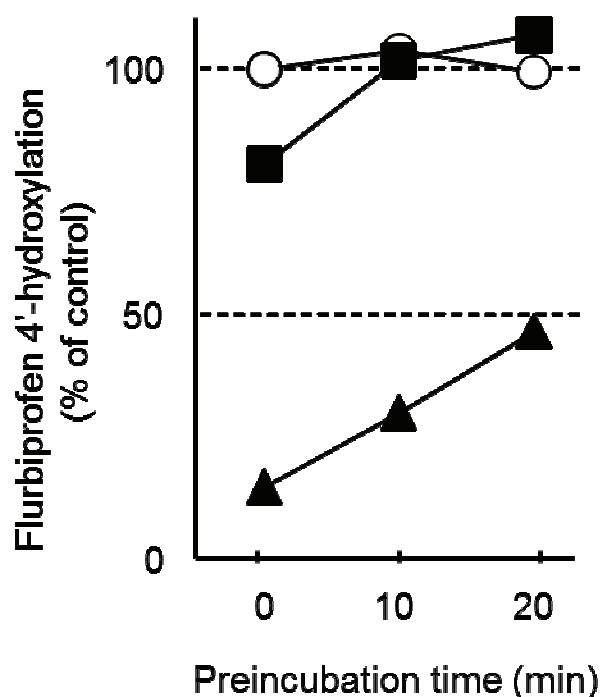


Fig. 3. Inhibitory potential of diclofenac (▲) and 4'-hydroxydiclofenac (■) with respect to P450 2C9-mediated flurbiprofen 4'-hydroxylation.

Diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac (50 μ M) were preincubated for 0–20 min in the presence of NADPH and recombinant P450 2C9. The residual flurbiprofen 4'-hydroxylation activities were plotted as the percentage of the control (○).

ジクロフェナクおよび4'-水酸化ジクロフェナクのヒト P450 1A2 および 2C9 に対するドッキングシミュレーションは報告されている結晶構造を用いて行った (Fig. 4)。ジクロフェナクおよび4'-水酸化ジクロフェナクは、酸化促進のため安定した相互作用エネルギーおよび距離 ($\sim 4 - 5 \text{ \AA}$) で P450 2C9 のヘム鉄の中心に結合した (Fig. 4B, 4D)。ジクロフェナクおよび4'-水酸化ジクロフェナクは、同様に P450 1A2 にも同様に結合した (Fig. 4A, 4C)。

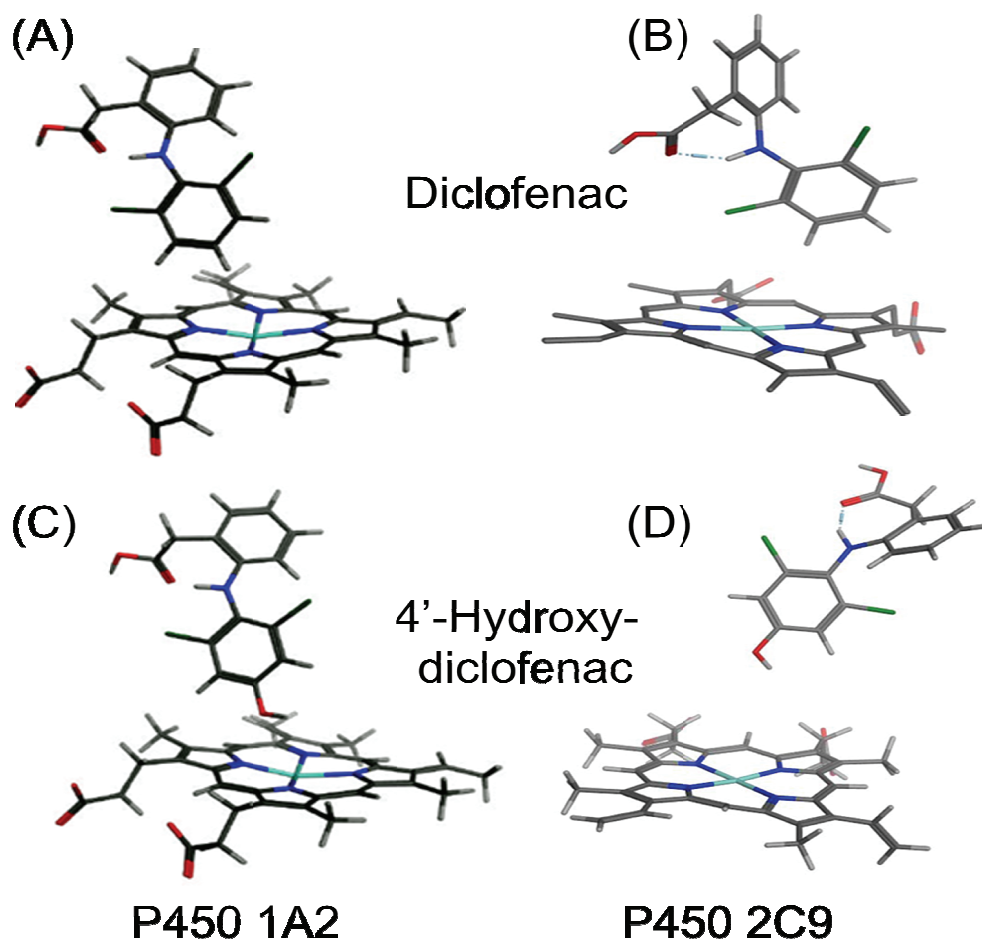


Fig. 4. Docking simulation of the interaction of diclofenac (A, B) and 4'-hydroxydiclofenac (C, D) with reported structures for human P450 1A2 (A, C) and P450 2C9 (B, D).

The heme group of the P450 is shown in the lower part of each figure. Oxygen, nitrogen, and iron atoms are coloured red, blue, and light blue, respectively. The interaction energies (U values) and distances to the heme center of diclofenac for P450 1A2 (A) and 2C9 (B) enzymes were -9.6 and -15.1 kcal/mol and 4.51 and 4.15 Å, respectively. Interaction energies and distances to the heme center of 4'-hydroxydiclofenac for P450 1A2 (C) and 2C9 (D) enzymes were -15.3 and -18.8 kcal/mol and 3.95 and 5.21 Å, respectively.

II-3-2 ジクロフェナクの人 P450 1A2 を介する薬物酸化反応に対する阻害作用

ヒト P450 1A2 とその他の P450 分子種に対するジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクの阻害作用を検討した。発現系 P450 1A2 とヒト肝ミクロゾームのリルゾール *N*-水酸化酵素活性に対して、ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクは同時のインキュベーションにおいては影響を与えなかった (Table 9)。同様に、P450 1A2 を介する 7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化酵素活性に対しても、ほとんど阻害作用を及ぼさなかった。それに対し、ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクは、P450 1A2 が触媒するカフェイン 3-*N*-脱メチル化酵素活性をそれぞれ、47%および 41%阻害した (Table 9)。同様に、テオフィリン 8-水酸化酵素活性も阻害した。P450 2C19 が触媒する *S*-メフェトニン 4'-水酸化酵素活性および P450 3A4 が触媒するミダゾラム 1'-水酸化酵素活性に対して、この条件下では阻害作用は示さなかった。

同時にインキュベーションした系に対し、50 μM と 100 μM の異なるジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクの濃度で 20 分間プレインキュベーションした系 (Fig. 5A) および NADPH 共存下、阻害剤 50 μM で 0、10 分、20 分プレインキュベーションした系 (Fig. 5B) も P450 1A2 とヒト肝ミクロゾームが触媒するリルゾール *N*-水酸化酵素活性を阻害した。これらの反応時間依存的なジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクの阻害作用は、7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化酵素活性に対しても見られた (Table 10)。しかしながら、P450 1A2 が触媒するカフェイン 3-*N*-脱メチル化酵素活性に対して濃度依存的に阻害作用を示したジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナク (50 μM および 100 μM , Fig. 5C) は、20 分間までのプレインキュベーションではより強く阻害することはなかった (Fig. 5D)。同様に、テオフィリン 8-水酸化酵素活性に対しても、ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクは 20 分間までのプレインキュベーションではより強い阻害作用は示さなかった (Table 10)。プレインキュベーション時間依存的なジクロフェナク P450 1A2 の阻害は、リルゾール *N*-水酸化酵素活性 (Fig. 6) と 7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化酵素活性 (Table 10) でも認められた。

Table 9. Inhibitory effects of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac without preincubation on drug oxidation activities of human P450 1A2, 2C19, and 3A4 enzymes.

Enzyme	Reaction	Activity (nmol/min/nmol P450)		
		Without inhibitor	With diclofenac	With 4'-hydroxydiclofenac
Recombinant P450 enzymes expressed in bacterial membranes				
1A2	Riluzole <i>N</i> -hydroxylation	12.5 (100)	12.2 (97)	12.0 (96)
	7-Ethoxyresorufin <i>O</i> -deethylation	0.88 (100)	0.84 (95)	0.81 (92)
	Caffeine 3- <i>N</i> -demethylation	2.2 (100)	1.2 (53)	1.3 (59)
	Theophylline 8-hydroxylation	4.7 (100)	3.5 (74)	3.7 (80)
2C19	<i>S</i> -Mephenytoin 4'-hydroxylation	1.7 (100)	1.7 (99)	1.7 (103)
3A4	Midazolam 1'-hydroxylation	7.0 (100)	7.3 (104)	7.3 (104)
Human liver microsomes				
	Riluzole <i>N</i> -hydroxylation	2.8 (100)	2.7 (97)	2.7 (96)
	7-Ethoxyresorufin <i>O</i> -deethylation	9.0 (100)	8.6 (95)	8.3 (92)

Drug oxidation activities of recombinant human P450 1A2, 2C19, and 3A4 or pooled human liver microsomes in the absence or presence of diclofenac or 4'-hydroxydiclofenac (50 μ M) are shown as the means of triplicate determinations. Values in parentheses show the percentage of the control.

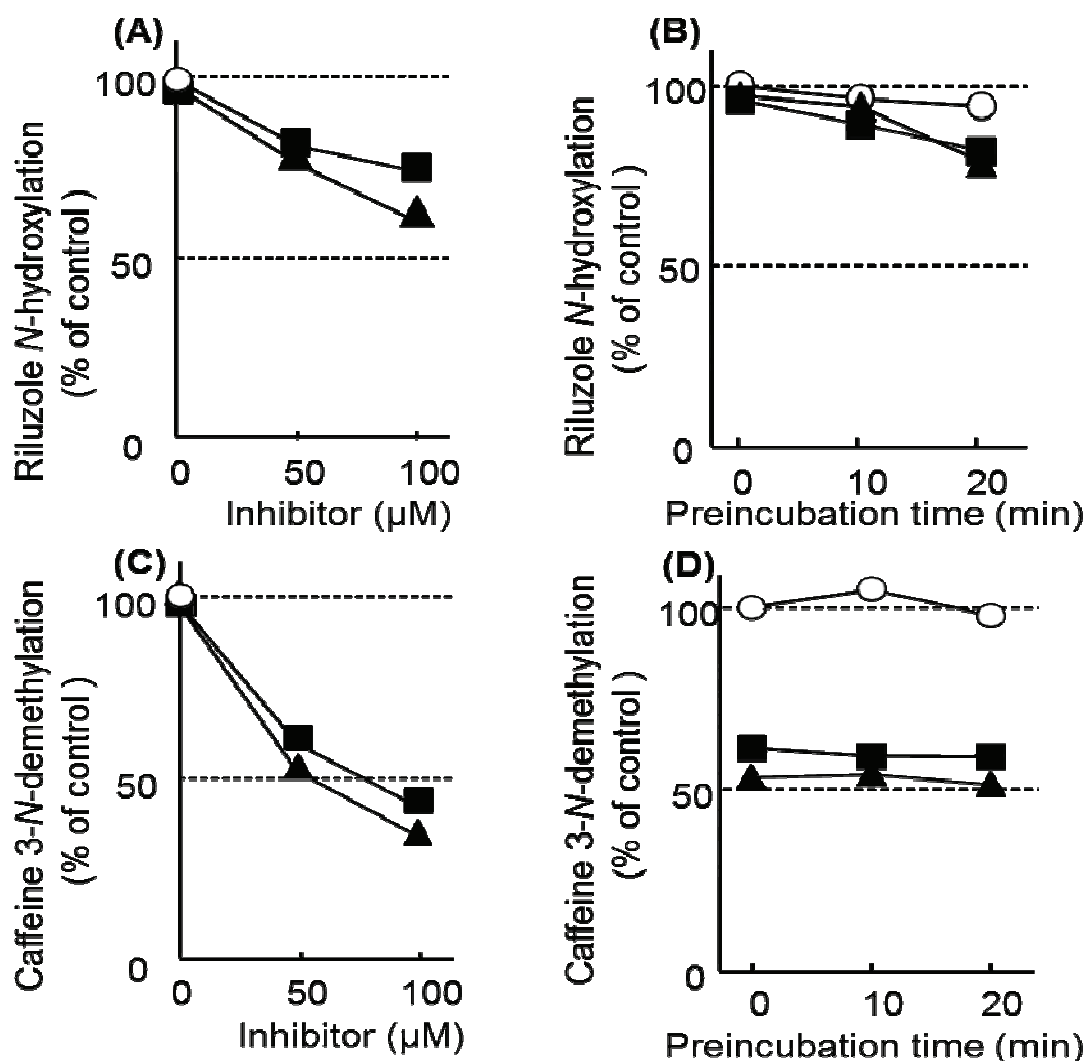


Fig. 5. Effects of concentrations of diclofenac (▲) and 4'-hydroxydiclofenac (■) (A,C) and preincubation time (B,D) on riluzole *N*-hydroxylation (A,B) and caffeine 3-*N*-demethylation activities (C,D) catalyzed by recombinant human P450 1A2.

After preincubation reactions with recombinant P450 1A2 and NADPH for 20 min at 37°C were carried out in the absence (○) or presence of diclofenac (0–100 μM, ▲) or 4'-hydroxydiclofenac (0–100 μM, ■), the substrate riluzole (A) and caffeine (C) were added to the reaction mixture. The residual drug oxidation activities were plotted as a percentage of the control. After preincubation reactions with recombinant P450 1A2 and NADPH for 0–20 min at 37°C were carried out in the absence (○) or presence of diclofenac or 4'-hydroxydiclofenac (50 μM), the substrate riluzole (B) or caffeine (D) was added to the reaction mixtures. The residual drug oxidation activities were plotted as a percentage of the control.

Table 10. Preincubation dependent inhibitory effects of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac on drug oxidation activities of human P450 1A2, 2C19, and 3A4 enzymes.

Enzyme	Reaction	Activity (nmol/min/nmol P450)		
		Without inhibitor	With diclofenac	With 4'-hydroxydiclofenac
Recombinant P450 enzymes expressed in bacterial membranes				
1A2	Riluzole <i>N</i> -hydroxylation	11.8 (94)	9.8 (79)	10.2 (82)
	7-Ethoxyresorufin <i>O</i> -deethylation	0.80 (91)	0.68 (77)	0.68 (77)
	Caffeine 3- <i>N</i> -demethylation	2.1 (98)	1.1 (51)	1.3 (61)
	Theophylline 8-hydroxylation	4.4 (94)	3.5 (75)	3.7 (80)
2C19	<i>S</i> -Mephenytoin 4'-hydroxylation	1.2 (74)	1.1 (68)	1.4 (82)
3A4	Midazolam 1'-hydroxylation	5.8 (83)	5.8 (83)	6.0 (86)
Human liver microsomes				
	Riluzole <i>N</i> -hydroxylation	2.8 (98)	2.3 (82)	Not done
	7-Ethoxyresorufin <i>O</i> -deethylation	7.9 (88)	7.1 (79)	Not done

Drug oxidation activities of recombinant human P450 1A2, 2C19, and 3A4 or pooled human liver microsomes after preincubation at 37°C for 20 min in the absence or presence of diclofenac or 4'-hydroxydiclofenac (50 µM) are shown as the means of triplicate determinations. Values in parentheses are the percentages of the control activities without preincubation reactions shown in Table 9.

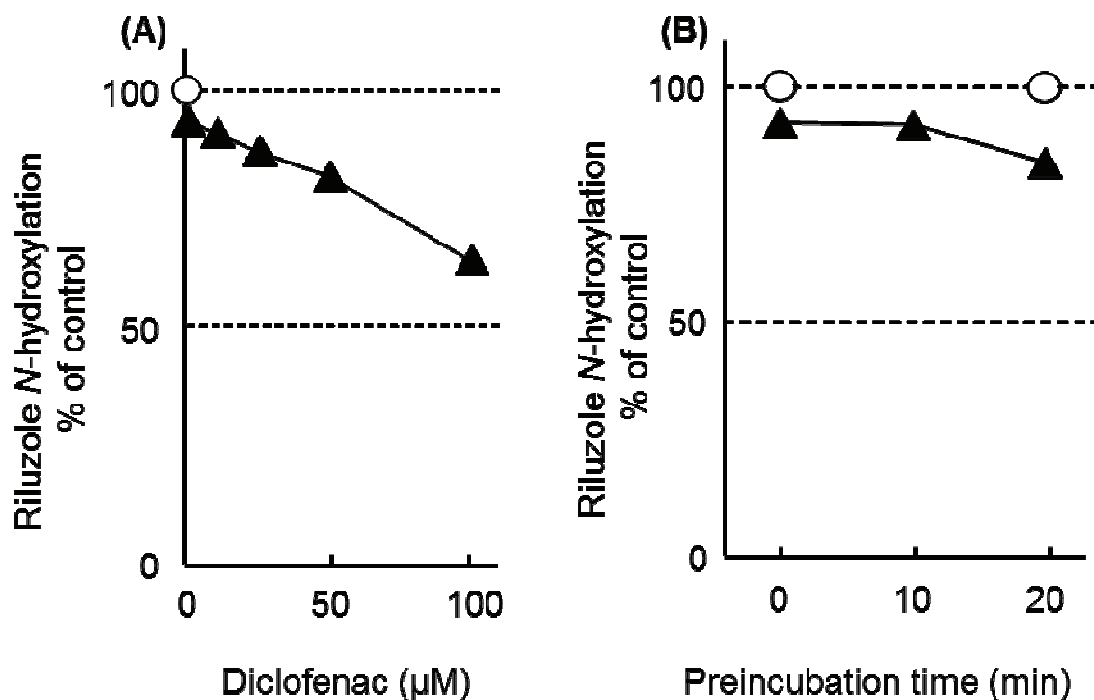


Fig. 6. Effects of concentration of diclofenac (A) and preincubation time (B) on riluzole *N*-hydroxylation activities catalyzed by human liver microsomes.

After preincubation reactions with human liver microsomes and NADPH for 20 min at 37°C were carried out in the absence (○) or presence of diclofenac (0–100 μM , ▲), the substrate riluzole was added to the reaction mixture and the residual drug oxidation activities were plotted as a percentage of control (A). Diclofenac (50 μM) was preincubated for 0–20 min at 37°C and then the residual riluzole *N*-hydroxylation activities were measured (B).

II-3-3 ジクロフェナクおよび4'-水酸化ジクロフェナク共存下での *in vivo* における AUC 上昇の予測

1+[I]/K_iの式から *in vivo* における AUC 上昇の予測するために、発現系 P450 1A2 とプールドヒト肝ミクロゾームを用いた *in vitro* の実験によるカフェイン 3-*N*-脱メチル化酵素活性に対するジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクの阻害定数を決定した。ヒト肝ミクロゾームを用いた系では、発現系 P450 1A2 に比べジクロフェナクおよび4'-水酸化ジクロフェナクの K_iがそれぞれ 37 μM および 26 μM とより小さい値が得られた (Table 11)。

肝ミクロゾームの P450 1A2 を介したジクロフェナク他剤との相互作用を予測するため、Table 12 に要約したように、文献報告⁴⁷⁾ されているジクロフェナクおよび4'-水酸化ジクロフェナクの最大血漿中濃度を引用し、2化合物の共存下、タンパク結合率を加味しない *in vitro* の実験からの K_i 値を用いて 1+[I]/K_iの式から *in vivo* における AUC の上昇を予測した。

Table 11. Kinetic constants of human P450 1A2-mediated caffeine 3-*N*-demethylation and the inhibition constants of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac for the same reaction.

Kinetic parameter	Caffeine 3- <i>N</i> -demethylation	
	P450 1A2	Human liver microsomes
V_{\max} (nmol/min/nmol P450)	1.2 ± 0.1	210 ± 9
K_m (μM)	550 ± 46	830 ± 84
K_i of diclofenac (μM)	77 ± 4	37 ± 2
K_i of 4'-hydroxydiclofenac (μM)	82 ± 8	26 ± 2

Noncompetitive inhibition by diclofenac or 4'-hydroxydiclofenac (0–200 μM, at five concentrations) on caffeine 3-*N*-demethylation (at five substrate concentrations of 250–1500 μM) was observed in recombinant P450 1A2 (0.040 μM equivalent) and in pooled human liver microsomes (1.0 mg protein/mL) after co-incubation for 20 min at 37°C. Inhibition constants were calculated by non-linear regression analysis and are represented as mean ± SE values for a total of 25 experimental points.

Table 12. Plasma concentrations of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac and estimated *in vivo* increases in the area of the plasma caffeine concentration–time curve in the presence of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac.

	Geometric mean (95% confidence interval)	Selected percentiles		
		50th	75th	95th
Plasma concentrations ^a				
Diclofenac (μM)	5.8 (4.6 – 6.9)	5.4	7.8	10.5
4'-Hydroxydiclofenac (μM)	0.40 (0.23 – 0.56)	0.32	0.39	1.73
Estimated increase in AUC ^b				
1 + [I]/K _i for diclofenac	1.16 (1.12 – 1.19)	1.15	1.21	1.29
1 + [I]/K _i for 4'-hydroxydiclofenac	1.01 (1.01 – 1.02)	1.01	1.01	1.05

^a The maximum plasma concentrations of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac in 20 male study participants were taken from the report by Kirchheiner *et al.* ⁴⁷⁾ and are expressed as means (95% confidence interval) and selected percentiles. After a fasting period of 12 h, 50 mg diclofenac sodium had been administered orally in its enteric-coated form (Voltaren[®], Novartis Pharma) to the study participants ⁴⁷⁾.

^b Inhibition constants of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac were 37 and 26 μM, respectively, for caffeine 3-*N*-demethylation activities by human liver microsomes, as show in Table 11, without any considerations for factor unbound to protein fractions *in vitro* or *in vivo*.

第4節 考察

ジクロフェナクは疼痛治療のため広く処方されており²⁹⁾、また、OTC 医薬品としても使用される。ジクロフェナクの1回の投与量は25 mg から100 mg であり、これは患者の状態や各国の承認時の用量設定によりさまざまである。ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性には大きな個体差があるが、これは P450 2C9 の遺伝的多型により生じる。例えば、CYP2C9*3 の V_{\max}/K_m は、CYP2C9*1 の10分の1であることが報告されている²⁵⁾。本研究では、P450 2C9 および P450 1A2 の V_{\max}/K_m はそれぞれ $0.626 \text{ min}^{-1}/\mu\text{M}$ および $0.006 \text{ min}^{-1}/\mu\text{M}$ であった。ジクロフェナクの阻害の強さは、P450 2C9 依存的な代謝クリアランスにより異なる。それゆえ、ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性における P450 1A2 の部分的な関与は P450 2C9 の単独関与よりも特に P450 2C9 の遺伝的多型を有した Poor Metabolizer や喫煙の習慣がある患者 (P450 1A2 が誘導される) では想定することができる。

高濃度 (1 mM) のジクロフェナクは P450 を介するリルゾール *N*-水酸化酵素活性を阻害したことが報告されている⁴⁰⁾。その報告において考慮されたジクロフェナク濃度は、Table 12 に示すとおり臨床における濃度に比べて高値であり⁴⁷⁾、実際に臨床における重要な薬物相互作用を引き起こすかは不明である。本研究では、ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクの阻害の強さが検討され、臨床における薬物濃度においても P450 1A2 を介した薬物相互作用が起こりうる可能性が示された。

ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクは、NADPH 共存下 20 分のプレインキュベーション後、P450 1A2 依存的なリルゾール *N*-水酸化酵素活性および 7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化酵素活性を阻害した (Table 10、Figs. 5 および 6)。一方で、P450 1A2 依存的なカフェイン 3-*N*-脱メチル化酵素活性およびテオフィリン 8-水酸化酵素活性に対し、ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクは、本条件下ではプレインキュベーション後も阻害作用を強めることはなかった (Table 10 および Fig. 5)。P450 の阻害のメカニズムに関し、ヒト P450 1A2 依存的な反応の結果、ジクロフェナクに由来する阻害的分子が関与する可能性が複数示唆された。

第一に、ジクロフェナク自身は直接的に P450 1A2 を介する反応を阻害する。ジクロフェナクの主代謝物である 4'-水酸化ジクロフェナクもまた、P450 1A2 を介する反応を阻害する。Table 9 に示すとおり、ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクは、カフェイン 3-*N*-脱メチル化酵素活性をコントロール活性のそれぞれ 47% およ

び41%阻害した。P450 1A2 が触媒するテオフィリン 8-水酸化酵素活性もまた、軽度ながらジクロフェナクおよび4'-水酸化ジクロフェナクによって阻害された (Table 9)。これらの結果は、ヒト肝マイクロゾームを用いたフェナセチン *O*-脱エチル化酵素活性に対し、ジクロフェナク (10 μ M) が部分的に阻害作用を示したこと⁴⁸⁾ と一致している。第二に、ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクは未知のさらなる代謝物を介して P450 1A2 依存的な反応を阻害する可能性がある。ドッキングシミュレーションにおいて (Fig. 4)、ジクロフェナクの芳香環と 4'-水酸化ジクロフェナクの水酸基は P450 1A2 のヘム鉄に近接していた。文献報告とドッキングシミュレーションの主な候補となるものから、ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクは、ヒト肝マイクロゾームに共有結合する 1',4'-ベンゾキノニン誘導体にさらに代謝されることが推測された⁴⁹⁾。P450 1A2 の阻害剤である α -ナフトフラボン³¹⁾ はジクロフェナクとタンパクのアダクト形成に影響を及ぼしたことが報告されており³¹⁾、このことは、ジクロフェナクがヒト肝マイクロゾームへの共有結合する際の役割の一部を担っていることを示唆している。これに関しては、ジクロフェナク由来のいずれの反応中間体が関与しているのか、さらなる検討が必要である。

上述のとおり、ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクの阻害作用が複数存在することは、ジクロフェナク由来の多数の阻害分子により説明され、これらの現象は、酵素と基質/代謝物の親和性により説明することができる。ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクの K_m 値は、リルゾールおよび 7-エトキシレゾルフィン⁴⁰⁾ とほぼ同等かそれよりも低く (< 30 μ M)、一方でカフェインおよびテオフィリンの K_m 値はジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクよりも高くなっている。それゆえ、 K_m 値が低い (高親和性) 基質による反応は、ジクロフェナクに起因する P450 1A2 による反応中間体生成のプロープに、カフェインのような K_m 値が高い (低親和性) 基質による反応は、ヒト P450 1A2 を介した薬物酸化反応をジクロフェナクもしくは 4'-水酸化ジクロフェナクにより直接的に阻害されるプロープに適していると推測される。

本研究により算出した阻害定数 (Table 11) および報告されている文献値 (Table 12) を用いて、ジクロフェナク共存下、基質の AUC の上昇率を評価した。米国食品医薬品局は、AUC の上昇が 10%を超える場合、薬物間相互作用に注意すべきと警告している²⁸⁾。それゆえ、ジクロフェナクは P450 1A2 によって主に代謝される薬物と臨床的に有意に薬物相互作用を引き起こしうる。4.72 という高い LogP 値のため、ジクロ

フェナクは肝臓に移行することが予想される。ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクに対する $K_{p,h}$ 値はそれぞれ 2.90 および 2.88 のため、Table 11 に要約しているとおおり、報告されている文献値から肝臓におけるジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクの平均最大血中濃度はそれぞれ 16.7 μM および 1.14 μM と推定された。同様の仮定の下 $1 + [I]/K_i$ の式を用い⁴⁷⁾、50 mg ジクロフェナクナトリウム単回経口投与後の最大肝臓中濃度を予測し、ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクによる酵素阻害の結果、カフェインのような対象基質の AUC の上昇率はそれぞれ 45% および 4% であった。同様に、Table 11 に示されている 95 パーセンタイルは、上述のように肝臓に蓄積したと仮定して算出するとジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクによりそれぞれ 82% および 13% 増加すると予測された。

第 5 節 小括

ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクは *in vitro* の系においてヒト P450 1A2 を介する酸化反応をプレインキュベーションおよび同時のインキュベーションで濃度依存的に阻害した。これらの結果により、ジクロフェナクは P450 1A2 依存的な薬物のクリアランスを阻害し、臨床的に影響を及ぼす可能性がある。*In vivo* おいてジクロフェナクは、P450 1A2 依存的な酸化反応を阻害することにより、併用もしくはジクロフェナク服用後に投与された薬物と臨床的に重要な薬物相互作用が起こる可能性がある。

総括

セルフメディケーションが推進される昨今、NSAIDs は処方箋医薬品としてはもちろん、OTC 医薬品として様々な剤型で幅広く使用されている。中でもジクロフェナクは、全剤型における有害事象の発現率は 30%を超え、特に重症度の高い心血管障害や脳血管障害などの有害事象の発現率は他の NSAIDs に比べ最も高いことが指摘されている。本剤は、チトクロム P450 2C9 を介した多くの医薬品との薬物相互作用が知られている。しかしながら、ジクロフェナク局所皮膚適用製剤に関しては、他の NSAIDs 含有局所皮膚適用製剤に比して、薬剤の全身循環に起因する有害事象を示唆する記載が添付文書に無く、安全性調査が必ずしも十分ではない可能性がある。このような背景からスイッチ OTC 化された医薬品の有害事象の発現リスクを評価し、その発症頻度を抑え、重篤化を回避することは、患者個々が意図した自己治療を支持し、ひいては最良な治療成果をもたらすことに繋がるものと期待される。

そこで本研究では、新一般用医薬品ジクロフェナク局所適用製剤が引き起こす有害事象を研究対象に取り上げた。医療機関からの処方薬およびその患者背景についてデータベースを活用したジクロフェナク使用実態に関する調査研究を行った。さらにジクロフェナク有害事象成因の詳細について、実験科学的に追求し、両手法を統合してジクロフェナクのリスク因子を総合的に評価することを目的とした。

第 I 章では、スイッチ OTC 医薬品ジクロフェナクの局所皮膚適用における副作用発現とリスク因子を評価した。日本調剤株式会社の全国 466 店舗に薬歴のある患者の中からボルタレン局所皮膚適用製剤（ゲル、テープまたはローション）の使用で副作用歴のある患者を抽出した。対象者のべ 145,478 人の中から得られた副作用件数は 595 件であった。そのうち、全身性副作用は 20 件で約半数は添付文書で注意喚起されている喘息等呼吸器系のものであった。一方、その副作用のうち、内服薬では見られるものの局所皮膚適用製剤の添付文書には記載されていない副作用も認められた。これら全身性副作用を発現したケース症例に対して年齢および性別でマッチングするコントロール症例を抽出し、ロジスティック回帰分析を行いオッズ比を算出したところ、喘息および併用薬数が有意であった。さらに、当該患者のジクロフェナク局所皮膚適用製剤との併用薬を精査したところ、本剤の主要代謝酵素である P450 2C9 以外の P450 基質となる薬剤が多く認められた。このことから、ジクロフェナクの局所皮膚適用製剤の全身性副作用のリスク因子は、既往歴として喘息と併用薬数の増加が挙

げられ、併用薬として P450 2C9 以外の P450 分子種を介する薬物相互作用が問題となる可能性が推察された。

第 II 章では、ジクロフェナクが多様な場面において多剤併用される可能性を考慮し、ヒト P450 分子種の各酵素活性の阻害作用の検討を行った。ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクは組換えヒト P450 2C9 が触媒する反応を阻害したが P450 2C19 および P450 3A4 が触媒する反応には影響を及ぼさなかった。NADPH 共在下、ジクロフェナクおよび 4'-水酸化ジクロフェナクは典型的な P450 1A2 の指標反応であるカフェイン 3-N-脱メチル化反応は同時インキュベーションによって阻害したが、リルゾール N-水酸化反応に対しては、プレインキュベーション後にその酵素活性を阻害した。ジクロフェナクの阻害定数 (37 μM) とジクロフェナクの通常量を経口投与後の最大血中濃度文献報告値 (95 パーセントイル値、10.5 μM) を用い、臨床における薬物相互作用の程度を $1 + [\text{Inhibitor}]/K_i$ 式より予測した。対象としたカフェインの AUC は、ジクロフェナクによって 29% 上昇することが推定された。ジクロフェナクは外用薬として使用される場合、添付文書上の投与量を容易に上回ることが懸念される。これらを総合すると、ジクロフェナクによる臨床薬物相互作用は、その代謝を担う P450 2C9 阻害に加え、P450 1A2 酵素活性の阻害によっても引き起こされる可能性があることが示唆された。

本研究により局所適用製剤ジクロフェナクの全身性副作用発現リスクは、患者個々の既往歴として喘息があり、併用される薬剤数が多い場合に上昇することが明らかとなった。ジクロフェナクは従前から注目されている P450 2C9 の他に、P450 1A2 を介する薬物相互作用を引き起こす可能性も示唆された。2013 年 4 月、ジクロフェナク局所適用製剤は OTC 販売分類が第 1 類から第 2 類に変更となり、医薬品販売時には薬剤師による文書での情報提供の義務が、薬剤師もしくは登録販売者による努力義務に緩和されることとなった。このような背景下、本研究により、地域医療における薬剤師の責務として、OTC 医薬品ジクロフェナク局所皮膚適用製剤も適正使用を促し、既往歴および併用される薬剤の P450 を介した相互作用に及ぼす特性を評価し、その有害事象を未然に防ぐリスク管理を積極的に行うことが重要であることが示唆された。

本研究で提唱した大規模データベースの調査研究と薬物相互作用を解明する実験研究を組み合わせた医薬品の有害事象評価手法は、薬事法改正下のスイッチ OTC 医薬品の潜在的な有害事象の新たなリスク管理手法のひとつとなることが期待される。

本論文内容の誌上発表

本論文の内容は下記の原著論文に発表した。

Katsuhiro Ohyama, Norie Murayama, Makiko Shimizu, and Hiroshi Yamazaki. Drug interactions of diclofenac and its oxidative metabolite with human liver microsomal cytochrome P450 1A2-dependent drug oxidation, *Xenobiotica* **44**; 10-16, 2014.

Katsuhiro Ohyama, Makiko Shimizu, and Hiroshi Yamazaki. A survey of adverse effects and risk factors for topical application of diclofenac, *Jpn J Pharm Health Care Sci* **40**; 310-316, 2014.

謝辞

本研究の主査として本論文の御審査を賜りました昭和薬科大学薬物治療学研究室 水谷顕洋教授に深く感謝の意を表します。副査として御審査を賜りました昭和薬科大学医療薬学教育研究センター薬剤師実務教育研究室 瀧本知之教授、同薬理学研究室 渡邊泰男教授に深く感謝致します。

稿を終えるにあたり、長年に渡りご指導ご鞭撻を賜ると共に、本研究の遂行ならびに研究成果の発表の機会を与えてくださった昭和薬科大学薬物動態学研究室 山崎浩史教授に謹んで深謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、患者情報のデータ抽出にご尽力いただきました日本調剤株式会社システム部 高橋真二部長、倫理審査でのご承認を賜りました社内倫理委員会の方々に感謝致します。

本稿の作成にあたり、多大なるご指導、数多くのご助言を賜りました昭和薬科大学薬物動態学研究室 清水万紀子講師、村山典恵講師ならびに同研究室の皆様にご深く感謝致します。

最後に、多大なご支援をいただきました両親と家族に感謝します。

参考文献

- 1) 法律第八十九号〔医療法の一部を改正する法律附則一三・一九条による改正〕, 平成4年7月1日.
- 2) 法律第八十四号「良質な医療を提供する体制の確立を図るための医療法等の一部を改正する法律」, 平成18年6月21日.
- 3) 日本再興戦略(平成25年6月14日閣議決定), 第78回科学技術部会 資料8-3, 平成25年7月12日.
- 4) 小田兵馬, 「セルフメディケーションの推進と期待すべき効果」チェーンドラッグストア協会意見書, 平成21年2月24日.
(<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/02/dl/s0224-11x.pdf>) cited 24 February, 2009.
- 5) 一般用医薬品(市販薬)の国内市場を調査, 株式会社富士経済 H. P.
(<https://www.fuji-keizai.co.jp/market/13045.html>) cited 11 June, 2013.
- 6) Catalano M. A. Worldwide safety experience with diclofenac. *Am J Med* **80** : 81-7, 1986.
- 7) McGettigan P. and Henry D. Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. *JAMA* **296** : 1633 – 1644, 2006.
- 8) Andersohn F., Schade R., Suissa S., Garbe E. Cyclooxygenase-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of ischemic stroke: A nested case-control study. *Stroke* **37** : 1725 – 1730, 2006.
- 9) Voltaren Gel 1% / Voltaren Lotion 1% Interview Form, 6th ed., Novartis Pharma. Co. Ltd., 2013.
- 10) Voltaren Tape 15mg/30mg Interview Form, 6th ed., Novartis Pharma. Co. Ltd., 2013.
- 11) Voltaren Tablets Interview Form, 11th ed., Novartis Pharma. Co. Ltd., 2012.
- 12) Moore R. A., Tramèr M. R., Carroll D., Wiffen P. J., McQuay H. J. Quantitative systematic review of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs. *BMJ*

- 316** : 333 – 338, 1998.
- 13) Heyneman C.A., Lawless-Liday C., Wall G.C., Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison. *Drugs* **60** : 555 – 74, 2000.
 - 14) Predel H. G., Koll R., Pabst H., Dieter R., Gallacchi G., Giannetti B., Bulitta M., Heidecker J. L., Mueller E. A. Diclofenac patch for topical treatment of acute impact injuries: a randomised, double blind, placebo controlled, multicentre study. *Br J Sports Med* **38** : 318 – 323, 2004.
 - 15) 足立裕史, 松尾辰朗, 鈴木和加恵, 高尾たみ江, 清純子. ケトプロフェン外用剤(モーラステープ)による重篤な接触性皮膚炎. 防衛衛生 **51**:65 – 268, 2004.
 - 16) 末吉富美子, 片山一朗. 化学物質による皮膚障害 : ケトプロフェン (ketoprofen) : モーラステープに含まれた ketoprofen による光接触皮膚炎. 医薬ジャーナル **40** : 2633 – 2637, 2004.
 - 17) 松山麻子, 菊池 康, 野村和夫. 接触性皮膚炎 : ケトプロフェン外用剤 (モーラステープ) による接触性皮膚炎の 1 例. 皮膚科の臨床 **42** : 1688 – 1689, 2000.
 - 18) 吉川剛史, 星 作男, 倉持美知雄, 呉 香代, 佐々木将博, 小川忠平, 鈴木直仁, 佐野靖之. ケトプロフェン貼付剤によるアスピリン喘息の 1 症例. アレルギーの臨床 **26** : 392, 2006.
 - 19) Krummel T., Dimitrov Y., Moulin B., Hannedouche T. Drug points: Acute renal failure induced by topical ketoprofen. *BMJ* **320** : 93, 2000.
 - 20) 金川武司, 富松拓治, 衣笠有基子, 味村和哉, 荻田和秀, 荒堀仁美, 小垣滋豊, 和田和子, 木村正. 湿布の大量貼付によって引き起こされたと思われる胎児動脈管早期収縮の一例. 日本周産期・新生児医学会雑誌 **44**:549, 2008.
 - 21) Guengerich F. P., Rendic S. Update information on drug metabolism systems--2009, part I. *Curr Drug Metab* **11** : 1 – 3, 2010.
 - 22) Rendic S., Guengerich F. P. Update information on drug metabolism systems--2009, part II: summary of information on the effects of diseases and environmental factors on human cytochrome P450 (CYP) enzymes and transporters. *Curr Drug*

- Metab* **11** : 4 – 84, 2010.
- 23) 榊原博樹, 末次 勸. 気管支喘息の病型分類とアスピリン喘息. 日本胸疾会誌 **33** (第35 回総会記録) : 106 – 115, 1995.
- 24) Loxonin Tape Package Insert, 5th ed., Daiichi Sankyo Co. Ltd., 2012.
- 25) Yamazaki H., Inoue K., Chiba K., Ozawa N., Kawai T., Suzuki Y., Goldstein J. A., Guengerich F. P., Shimada T. Comparative studies on the catalytic roles of cytochrome P450 2C9 and its Cys- and Leu-variants in the oxidation of warfarin, flurbiprofen, and diclofenac by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **56** : 243 – 5, 1998.
- 26) Kienzler J.L., Gold M., Nollevaux F. *J Clin Pharmacol* **50** : 50 – 61, 2010.
- 27) Qato D.M., Alexander G.C., Conti R.M., Johnson M., Schumm P., Lindau S.T. Use of prescription and over-the-counter medications and dietary supplements among older adults in the United States. *JAMA* **300**:2867 – 78, 2008.
- 28) Huang S., Strong J., Zhang L. Reynolds K.S., Nallani S., Temple R., Abraham S., Habet S.A., Baweja R.K., Burckart G.J., Chung S., Colangelo P., Frucht D., Green M.D., Hepp P., Karnaukhova E., Ko H.S., Lee J.I., Marroum P.J., Norden J.M., Qiu W., Rahman A., Sobel S., Stifano T., Thummel K., Wei X.X., Yasuda S., Zheng J.H., Zhao H., Lesko L.J. New era in drug interaction evaluation: US Food and Drug Administration update on CYP enzymes, transporters, and the guidance process. *J Clin Pharmacol* **48** : 662 – 70, 2008.
- 29) Small R.E. Diclofenac sodium. *Clin Pharm* **8** : 545 – 8, 1989 .
- 30) Leemann T., Transon C., Dayer P. Cytochrome P450TB (CYP2C) : a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver. *Life Sci* **52** : 9 – 34, 1993.
- 31) Shen S., Marchick M.R., Davis M.R., Doss G.A., Pohl L.R. Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450 3A4: role of 5-hydroxydiclofenac. *Chem Res Toxicol* **12** : 214 – 22, 1999.
- 32) Tang W., Stearns R.A., Wang R.W., Chiu S.H., Baillie T.A. Roles of human hepatic cytochrome P450s 2C9 and 3A4 in the metabolic activation of diclofenac. *Chem*

- Res Toxicol* **12** : 192 – 9, 1999.
- 33) Riess W., Stierlin H., Degen P., Faigle J.W., Gérardin A., Moppert J., Sallmann A., Schmid K., Schweizer A., Sulc M., Theobald W., Wagner J. Pharmacokinetics and metabolism of the anti-inflammatory agent voltaren. *Scand J Rheumatol Suppl* **22** : 17 – 29, 1978.
- 34) Faigle J.W., Böttcher I., Godbillon J., Kriemler H.P., Schlumpf E., Schneider W., Schweizer A., Stierlin H., Winkler T. A new metabolite of diclofenac sodium in human plasma. *Xenobiotica* **18** : 1191 – 7, 1988.
- 35) Kilford P.J., Stringer R., Sohal B., Houston J.B., Galetin A. Prediction of drug clearance by glucuronidation from *in vitro* data: use of combined cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase cofactors in alamethicin-activated human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **37**:82 – 89, 2009.
- 36) Poon G.K., Chen Q., Teffera Y., Ngui J.S., Griffin P.R., Braun M.P., Doss G.A., Freedman C., Stearns R.A., Evans D.C., Baillie T.A., Tang W. Bioactivation of diclofenac via benzoquinone imine intermediates – identification of urinary mercapturic acid derivatives in rats and humans. *Drug Metab Dispos* **29** : 1608 – 13, 2001.
- 37) Grillo M.P., Knutson C.G., Sanders P.E., Waldon D.J., Hua F., Ware J.A. Studies on the chemical reactivity of diclofenac acyl glucuronide with glutathione: identification of diclofenac-S-acyl-glutathione in rat bile. *Drug Metab Dispos* **31** : 1327 – 1336, 2003.
- 38) Yamazaki H., Nakamura M., Komatsu T., Ohyama K., Hatanaka N., Asahi S., Shimada N., Guengerich F.P., Shimada T., Nakajima M., Yokoi T. Roles of NADPH-P450 reductase and apo- and holo-cytochrome b5 on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **24** : 329 – 37, 2002.
- 39) Akiyoshi T., Saito T., Murase S., Miyazaki M., Murayama N., Yamazaki H., Guengerich F.P., Nakamura K., Yamamoto K., Ohtani H. Comparison of the inhibitory profiles of itraconazole and cimetidine in cytochrome P450 3A4 genetic

- variants. *Drug Metab Dispos* **39** : 724 – 28, 2011.
- 40) Sanderink G.J., Bournique B., Stevens J., Petry M., Martinet M. Involvement of human CYP1A isoenzymes in the metabolism and drug interactions of riluzole *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* **282** : 1465 – 72, 1997.
- 41) Ohyama K., Nakajima M., Nakamura S., Shimada N., Yamazaki H., Yokoi T. A significant role of human cytochrome P450 2C8 in amiodarone *N*-deethylation: an approach to predict the contribution with relative activity factor. *Drug Metab Dispos* **28** : 1303 – 10, 2000.
- 42) Shimada T., Gillam E.M.J., Sutter T.R., Strickland P.T., Guengerich F.P., Yamazaki H. Oxidation of xenobiotics by recombinant human cytochrome P450 1B1. *Drug Metab Dispos* **25** : 617 – 22, 1997.
- 43) Ohyama K., Nakajima M., Suzuki M., Shimada N., Yamazaki H., Yokoi T. Inhibitory effects of amiodarone and its *N*-deethylated metabolite on human cytochrome P450 activities: Prediction of *in vivo* drug interactions. *Br J Clin Pharmacol* **49** : 244 – 53, 2000.
- 44) Emoto C., Murayama N., Yamazaki H. Effects of phospholipids enzyme sources on midazolam 1'-hydroxylation activity catalyzed by recombinant cytochrome P450 3A4 in combination with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Drug Metab Lett* **2** : 190 – 2, 2008.
- 45) Yamazaki H., Nakamoto M., Shimizu M., Murayama N., Niwa T. Potential impact of cytochrome P450 3A5 in human liver on drug interactions with triazoles. *Br J Clin Pharmacol* **69** : 593 – 7, 2010.
- 46) Poulin P., Theil F.P. Prediction of pharmacokinetics prior to *in vivo* studies. 1. Mechanism-based prediction of volume of distribution. *J Pharm Sci* **91** : 129 – 56, 2002.
- 47) Kirchheiner J., Meineke I., Steinbach N., Meisel C., Roots I., Brockmüller J. Pharmacokinetics of diclofenac and inhibition of cyclooxygenases 1 and 2: no relationship to the CYP2C9 genetic polymorphism in humans. *Br J Clin Pharmacol* **55** : 51 – 61, 2003.

- 48) Karjalainen M.J., Neuvonen P.J., Backman J.T. *In vitro* inhibition of CYP1A2 by model inhibitors, anti-inflammatory analgesics and female sex steroids: predictability of *in vivo* interactions. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **103**: 157 – 65, 2008.
- 49) Madsen K.G., Skonberg C., Jurva U., Cornett C., Hansen S.H., Johansen T.N., Olsen J. Bioactivation of diclofenac *in vitro* and *in vivo*: correlation to electrochemical studies. *Chem Res Toxicol* **21**: 1107 – 19, 2008.