

## 緒言

シトクロム P450 (総称を P450、個別分子種を CYP と略す) は、生体内の様々な代謝に関与するヘムタンパク質であり、代謝部位における薬物間相互作用の大半が P450 を介している。この P450 を介した薬物間相互作用(DDI)には、酵素阻害によって併用基質濃度を上昇させる場合や酵素の活性化および誘導によって併用基質濃度を減少させる場合があり、薬効の減弱や副作用の増強の程度によっては併用を制限されるのみならず mibefradil、terfenadine、cisapride、cerivastatin、astemizole などのように市場から姿を消すことになる。したがって、創薬段階において P450 に対する阻害、誘導および活性化のリスクが小さい化合物を選択することは極めて重要である。本研究では、酵素阻害と活性化に着目し、創薬プロセスにおける DDI リスクを評価することを目的とした。

酵素阻害については近年改定された Food and Drug Administration (FDA)のドラフトガイダンスや European Medicines Agency (EMA)のガイドラインは、肝ミクロソームなど *in vitro* 試験から算出された阻害率(IC<sub>50</sub> や K<sub>i</sub>)と阻害剤の血漿中濃度の比を用いて臨床相互作用試験実施の有無を判断するよう記載されているが、その基準は両機関で異なっている。本研究では両基準の比較から、それぞれのリスク評価の妥当性を調べるとともに、基準の違いの原因となっている血漿および肝ミクロソームタンパク結合に着目し、タンパク結合の影響を *in vitro* 試験に組み入れた P450 阻害試験の予測精度を検証した。酵素活性化については、臨床報告が少なく、その重要性についてはまだ不明な点が多い。そこで、創薬プロセスにおける活性化のリスク評価のため、基質特異性および種差を明らかにすることにより動物を用いた *in vivo* 試験の実践的な利用法について検討した。

## 1. 当局ガイドラインおよびガイダンスの薬物間相互作用リスク評価の比較

2012年に公開された EMA のガイドラインにおける P450 を介した薬物間相互作用(DDI)のリスク評価法を検証し、FDA のドラフトガイダンスとの比較検討を実施した。EMA は DDI に対するリスク評価の際、非結合型分率を考慮するよう言及している。そこで、35 の臨床相互作用試験の結果についてレトロスペクティブに EMA の DDI 評価法を検証したところ、本評価法は薬物併用時の血漿中濃度下面積(AUC)の増加が2倍より大きい中程度~強い DDI を正しく評価した。一方で、薬物併用時の AUC が 2 倍以下である弱い DDI を過小評価する傾向が認められた。EMA と FDA の DDI に対するリスク評価の違いは血漿の非結合型分率( $f_p$ )と肝ミクロソーム反応液中の非結合型分率( $f_{u,mic}$ )の違いが起因しており、理論的には  $f_p/f_{u,mic}$  の比が 0.2 の場合に両者の評価は同等の結果となる。今回評価した阻害剤のうち 60% において  $f_p/f_{u,mic}$  は 0.2 より小さい値を示しており、EMA よりも FDA の方が厳しい基準であることが示唆された。実際、FDA の評価法に従うと roxithromycin, quinidine, sertraline, sulphinpyrazone および fluvastatin については DDI リスクを有し、臨床で薬物相互作用試験が要求されるが EMA の評価法ではそれらの DDI リスクを過小評価した。

レトロスペクティブ研究を通して、EMA と FDA の実践的な違いを明らかにし、それらの DDI 評価法には改善の余地があることを示した。非結合型分率での補正の有効性についてはより定量的な DDI 予測で検証する必要性が考えられた。

## 2. 血清添加凍結肝細胞を用いた DDI の定量的予測

血清添加凍結肝細胞を用いて、DDI 予測に使用する適切な阻害剤濃度(II)を探索し、DDI の定量的な予測精度について検証した。CYP2C9, CYP2D6 および CYP3A4 に対する 31 の阻害剤を用いて凍結肝細胞における P450 阻害を血清添加の有無で評価した。肝臓での DDI を評価するため、CYP2C9 および CYP2D6 阻害剤の臨床相互作用データを用いてレトロスペクティブ解析を行った。最大門脈中濃度(II<sub>in</sub>)と血清添加凍結肝細胞から得られた K<sub>i</sub> の比を使用した場合、薬物併用時の AUC の増加率(AUC<sub>i</sub>/AUC)を最も精度よく予測することができた。評価した試験の 90% について AUC<sub>i</sub>/AUC の予測値が実測値の 2 倍以内であった。一方、循

環血中の平均血漿中濃度( $[I]_{av}$ )や最大血漿中濃度( $[I]_{max}$ )を使用した場合、 $AUC_i/AUC$  を過小評価した。以上の結果から、血清添加凍結肝細胞を用いた DDI 予測において $[I]_{in}$ が $[I]$ の良いサロゲートであり、本試験系はタンパク結合の影響を *in vitro* 試験に組み入れた DDI 予測法として有用であることが示唆された。

### 3. CYP3A の活性化の *in vitro* および *in vivo* 評価

CYP3A を介した midazolam の代謝を活性化することが報告されている efavirenz を用いて、CYP3A の活性化の基質特異性および種差を明らかにするとともに、*in vitro* 試験で認められた活性化の *in vivo* での影響を動物モデルで評価した。

はじめに、CYP3A 基質である midazolam, testosterone, nifedipine の酸化代謝における efavirenz の影響をラット、サルおよびヒト肝ミクロソームを用いて評価した。サルおよびヒト肝ミクロソームでは efavirenz は濃度依存的に midazolam の水酸化を活性化したが、ラットでは活性化は認められなかった。また、いずれの肝ミクロソームにおいても efavirenz は nifedipine および testosterone の酸化代謝を活性化しなかった。次に、サルを用いて midazolam の血漿中濃度推移に与える efavirenz の影響を調べた。Efavirenz の併用により midazolam/1'-hydroxymidazolam の血漿中濃度下面積(AUC)比は約半分に減少したが、midazolam 自身の AUC の減少は 20%程度であり *in vivo* での影響は顕著ではなかった。

以上、efavirenz による CYP3A 活性化の種差および基質特異性を明らかにした。*in vitro* の *in vivo* への外挿性については更なる検討が必要であるが、臨床での報告事例が少ない活性化のようなリスク評価は、*in vitro* でヒトを反映するような動物種を見出し、動物を用いて *in vivo* での作用を確認していくことで、総合的にリスク評価する必要があることが示された。

### 結論

本研究を通して、タンパク結合の考慮の有無による当局の DDI に対する基準の違いが、化合物の P450 阻害リスク評価に及ぼす影響を明らかにし、それらの基準には改善の余地があることを示した。日本版ガイドランスが双方の良さを取り入れて改良されることを期待したい。タンパク結合の影響を *in vitro* 試験に組み入れた血清添加凍結肝細胞を用いた DDI 予測は、定量的な予測を可能とするため、創薬段階における P450 阻害のリスク評価および創薬段階における化合物の最適化に大きく貢献すると考えられた。創薬プロセスにおける活性化のリスク評価として、*in vitro* 試験で基質特異性および種差を明らかにした上で、動物を用いた *in vivo* 試験を実施し総合的にリスク判断することで、臨床事例がまだ十分でない P450 の活性化を介した薬物相互作用についても DDI リスクの低い化合物選択を可能にすると推察された。

### 本研究の誌上発表

- Kosugi Y, Hirabayashi H, Igari T, Fujioka Y, Hara Y, Okuda T, Moriwaki T. (2012) Evaluation of cytochrome P450-mediated drug-drug interactions based on the strategies recommended by regulatory authorities. *Xenobiotica*. **42**(2):127-38.
- Kosugi Y, Hirabayashi H, Igari T, Fujioka Y, Okuda T, Moriwaki T. (2013) Risk assessment of drug-drug interactions using hepatocytes suspended in serum during the drug discovery process. *Xenobiotica*. **44**(4):336-44.
- Kosugi Y, Takahashi J. (2015) Species differences and substrate specificity of CYP3A heteroactivation by efavirenz. *Xenobiotica*. **45**(4):345-52.

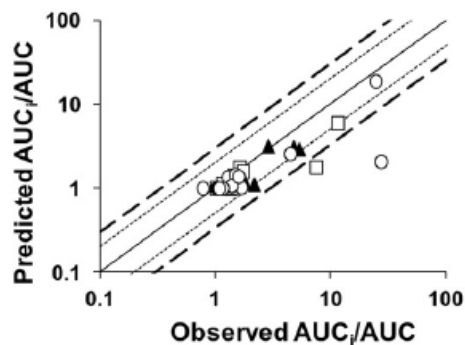


Fig.1 Relationship between  $[I]_{in}/K_i$  ratio versus *in vivo*  $AUC_i/AUC$  for CYP2C8(●), CYP2C9(▲), CYP2D6(□) and CYP3A4(○). Solid line represents line of unity. The area between the dotted lines represents an area within 2-fold error. The area between the dashed lines represents an area within 3-fold error.