

Cytochrome P450 3A基質となる薬物の消化管及び肝初回通過効果と

その予測に関する研究

1999年

東川 史子

目次

序論	1
本論	6
第1章 Midazolamの全身及び肝クリアランス	6
第1節 全身クリアランス(急速単回静注)	8
第2節 肝抽出率及び肝クリアランス(定速静注)	13
第3節 小括	16
第2章 MidazolamのBioavailabilityと消化管初回通過効果	17
第1節 Bioavailabilityに及ぼすラット週齢の影響(空腸ループ内投与)	19
第2節 Bioavailabilityに及ぼす各種酵素誘導剤の影響(空腸ループ内投与)	21
第3節 Bioavailabilityに及ぼすKetoconazoleの影響(空腸ループ内投与)	22
第4節 消化管初回通過効果(In situ腸管ループ全血回収法)	24
第5節 In vitro消化管代謝	29
第6節 小括	30
第3章 ErythromycinのBioavailabilityと消化管初回通過効果	31
第1節 Bioavailabilityに及ぼすDexamethasone及びMidazolamの影響(空腸ループ内投与)	32
第2節 消化管初回通過効果(In situ腸管ループ全血回収法)	34
第3節 In vitro肝代謝	36
第4節 小括	38
第4章 MidazolamとErythromycinの初回通過効果の比較	39
第1節 消化管初回通過効果の比較	40
第2節 肝初回通過効果の比較	41
第3節 小括	43
第5章 In vitro代謝実験によるMidazolamのin vivo肝抽出率の予測	44
第1節 In vitro肝固有クリアランスの算出	45
第2節 In vitro肝固有クリアランスからin vivo肝抽出率の予測(代謝活性亢進時)	48
第3節 In vitro肝固有クリアランスからin vivo肝抽出率の予測(代謝活性低下時)	52
第4節 小括	57

総括.....	58
謝辞.....	62
実験の部.....	63
参考文献.....	72

略号一覧表

1. 薬物

CLO : Clotrimazole
 DEX : Dexamethasone
 EM : Erythromycin
 KCZ : Ketoconazole
 MDZ : Midazolam
 PB : Phenobarbital
 PCN : Pregnenolone 16 α -carbonitrile

2. 薬物動態学的パラメーター

AUC : Area under the blood (or plasma) concentration-time curve
 C_a : Arterial plasma concentration
 C_f : Free concentration
 CL_H : Hepatic clearance
 CL_{int} : Intrinsic clearance
 CL_{total} : Total clearance
 C_p : Portal venous plasma concentration
 C_{ss} : Steady-state plasma concentration
 C_v : Hepatic venous plasma concentration
 ER_G : Intestinal extraction ratio
 ER_H : Hepatic extraction ratio
 F_a : Absorption ratio
 f_B : Free fraction in blood
 F_G : Intestinal availability
 F_H : Hepatic availability
 f_P : Free fraction in plasma
 K_i : Inhibition constant
 Q_H : Hepatic blood flow rate

3. その他

CYP : Cytochrome P450
 P-gp : P-Glycoprotein

序 論

経口投与された薬物が薬効を発現するためには、標的臓器における薬物濃度が有効なレベルに到達する必要がある。即ち薬物の動態及び薬効発現を検討するためには投与部位から標的臓器への移行に関わるpharmacokineticsと、標的部位における受容体との結合性などpharmacodynamicsの両者の過程を考えなければならない。吸収、分布、代謝、排泄及び受容体への結合など全ての過程において種差、個体差、病態差、年齢差、性差などがあり、さらに、薬物代謝酵素活性は環境や他の薬剤の併用により容易に変動するために、薬物療法を行う際にはこれらの変動要因を考慮する必要がある。Pharmacokineticsの支配要因として重要な薬物代謝酵素と、pharmacodynamicsに重要な薬理レセプターの両者の蛋白を健常人において比較した場合、薬理レセプターの種差や変異は比較的少なく、種差、個体差が著しいのは薬物代謝酵素であるという説が提唱されている¹⁾。

このような観点から薬物の血中濃度が、薬効や毒性発現の指標として用いられ、有効濃度から中毒濃度までの範囲(治療域)が狭い薬物や薬物相互作用の恐れのある薬物(アミノグリコシド系抗生物質、cyclosporine、theophyllineなど)は、血中濃度モニタリング(therapeutic drug monitoring, TDM)が临床上必須となっている。薬物療法において、場合によっては多種の薬剤が併用される背景から、薬物相互作用が惹起され社会的にも大きな問題となっている。特に、ソリブジン事件に代表されるような死につながる重篤な薬物相互作用も記憶に新しい。これら薬物代謝酵素活性や代謝に関わる薬物相互作用を防ぐためには、その相互作用の程度を予測し得るシステムの構築が重要な課題と言える。

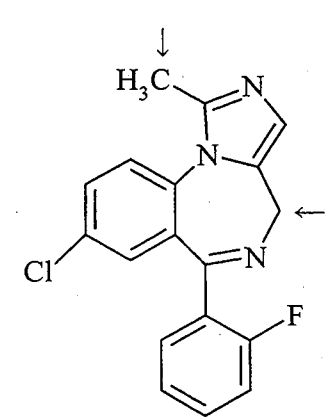
Cytochrome P450(CYP)は各種ステロイドホルモンなどの内因性物質や、薬物及び環境汚染物質など外因性物質の代謝に関与している酵素群である^{2, 3)}。CYPはそのアミノ酸配列の相同性によりファミリー(40%)、さらにサブファミリー(55%)に分類され、個々の分子種はCYP2D6、CYP3A4のように命名されている^{4, 5)}。中でもCYP3Aサブファミリーは、ヒト肝のCYPの中で最も豊富に含まれる酵素群で、シクロスポリンなどの免疫抑制剤やマクロライド系抗生物質、カルシウム拮抗剤、ステロイドホルモンなど、临床上用いられる多くの薬物を代謝することが知られている^{6, 7)}(Table 1)。近年、CYP3Aは消化管上皮細胞にも存在し、肝とほぼ同程度あるいはそれ以上の初回通過効果を示すことが明らかにされてきた⁸⁻¹³⁾。

CYP3Aは次のような特徴を有している。(1) 一般にCYP3A基質を経口投与した時のbioavailabilityは10~50%と低く、消化管及び肝中のCYP3A活性は20倍以上の個体差があることから、CYP3A基質の投与量設定を困難にしている^{14, 15)}。(2) CYP3A活性はketoconazoleなどのCYP3A阻害剤や他の基質との併用により阻害される他、グレープフルーツジュースや赤ワインのような食物中成分によっても阻害を受け、bioavailabilityが上昇することが問題となっている(Table 2)¹⁶⁻²³⁾。(3) CYP3Aは抗てんかん薬や抗結核薬rifampicin(rifampin)などにより酵素誘導され代謝が亢進する(Table 3)。(4) CYP3A

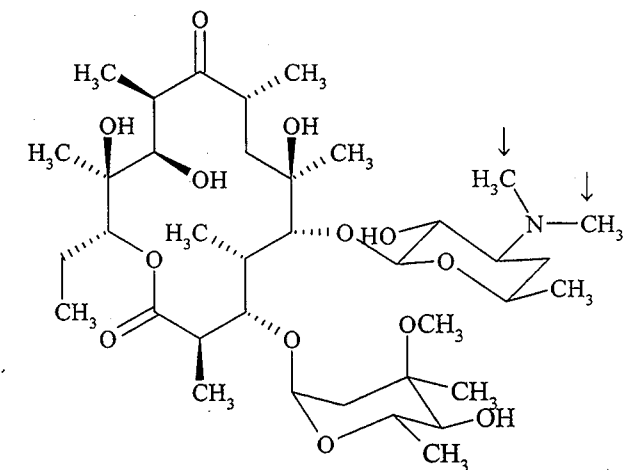
とP-糖蛋白質(ATP依存的な薬物の細胞外排出ポンプ、P-gp)では、基質や阻害剤に共通のものが多く、それらの併用により薬物相互作用が惹起される²⁴⁾。

動物を用いて代謝に関わる薬物動態やその予測について研究する場合、関与する代謝酵素がヒトと同じか、またその発現量は妥当かなど、あらかじめ詳細に検討する必要がある。CYPの分子種の中には、動物種の分化または進化と平行しているものもあるが、CYP3AサブファミリーやCYP2ファミリーでは動物種が分岐してからその動物種内で種独自に分化が起こり、多数の分子種ができたものと考えられている。そのため、ヒトに存在するCYP3AやCYP2Cの個々の分子種に厳密に対応する分子種は他の動物種には存在しない²⁵⁾。CYP3AはcDNAクローンが得られた順に動物種に関係なく順番に番号が付けられており、現在までに20種以上の分子種が知られている(Table 4)。ヒトではCYP3A3、CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7、ラットではCYP3A1、CYP3A2、CYP3A9、CYP3A18、及びCYP3A23が発見されているが、そのアミノ酸配列の相同性は高い^{26, 27)}。

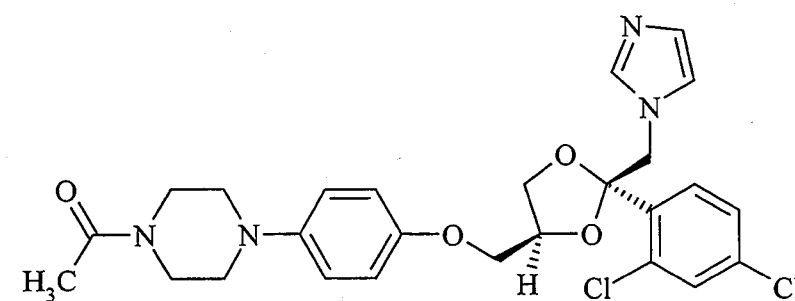
本研究ではCYPの中でも特に薬物代謝に重要な役割を担っているCYP3Aに注目し、midazolam及びerythromycinをCYP3A代謝のプロープとして使い、ラットにおけるこれら薬物の体内動態に及ぼす各種酵素阻害剤・誘導剤の影響を比較検討した。Midazolam及びerythromycinはいずれもヒト及びラットの両者においてCYP3Aの基質となることが知られている^{15, 28-30)}。CYP3Aは肝のみならず小腸でも発現しており、特に消化管における初回通過効果及び薬物相互作用はほぼCYP3Aによって説明される。ErythromycinはさらにP-gpの基質としても報告があり、薬物相互作用の解析を複雑なものにしている。本実験では、初回通過効果を肝と消化管で分離評価し、両基質の動態特性を比較した。さらにmidazolamについて、肝ミクロソームを用いたin vitro代謝実験よりin vivo代謝を予測するシステムの構築を試みた。実験にあたり、肝のCYP3A活性を酵素誘導剤前処置やCYP3A阻害剤を併用することにより変化させ、代謝活性亢進時及び代謝活性低下時の両条件下で検討した。CYP3A代謝プロープとして用いたmidazolam、erythromycin及びCYP3A阻害剤として用いたketoconazole、また酵素誘導剤として用いたdexamethasone、clotrimazoleなどの構造をFig.1に示した。



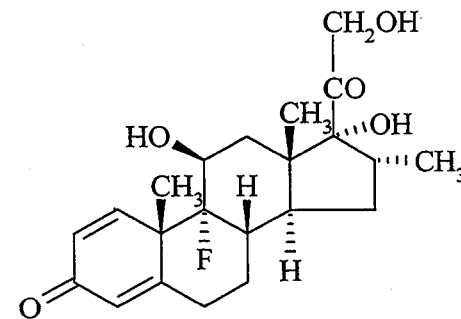
Midazolam (MDZ) M.W. 325.77



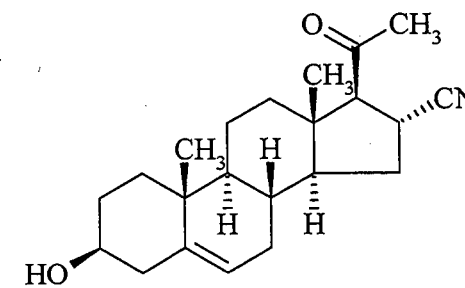
Erythromycin(EM) M.W. 733.94



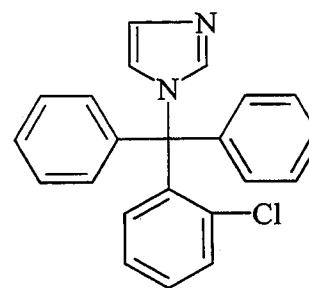
Ketoconazole (KCZ) M.W. 531.44



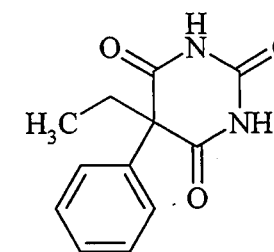
Dexamethasone (DEX) M.W. 392.47



Pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) M.W. 341.5



Clotrimazole (CLO) M.W. 344.84



Phenobarbital (PB) M.W. 232.24

Fig.1 Chemical structure and its abbreviation of CYP3A substrates, inhibitors, and inducers used in the present study
 \downarrow : Metabolic site by CYP3A. () : Abbreviation.

Table 1 Examples of CYP3A substrates reported

Antiarrhythmic agents:
Amiodarone, Lidocaine, Propafenone, Quinidine
Anticancer drugs:
Cyclophosphamide, Taxol
Antiepileptic agent:
Carbamazepine, Trimethadione
Antitussives:
Codeine, Dextromethorphan
Benzodiazepines:
Alprazolam, Midazolam, Triazolam
Calcium channel antagonists:
Diltiazem, Felodipine, Nifedipine, Niludipine, Nimodipine, Nisoldipine, Nitrendipine, Verapamil
Cholesterol-lowering agents:
Lovastatin, Simvastatin
Immunosuppressive agents:
Cyclosporine A, Tacrolimus(FK-506)
Macrolide antibiotics:
Erythromycin, Rapamycin, Troleandomycin
Nonsedating antihistamines:
Astemizole, Terfenadine
Opioid agents:
Alfentanil, Sulfentanil
Steroids:
Cortisol, 17 α -Ethinylestradiol, Testosterone
Miscellaneous:
Acetaminophen, Aflatoxin B ₁ , Alpidem, Benzo[a]pyrene, Cisapride, Clozapine, Cocaine, Dapsone, Imipramine, Losartan, Retinoic acid, Sulfamethoxazole, Tamoxifen, Theophylline, Warfarin

2, 4, 31-36)

Table 2 Examples of CYP3A inhibitors reported

Macrolide antibiotics:
Erythromycin, Troleandomycin, Clarithromycin, Josamycin, Midecamycin
Calcium-channel antagonists:
Diltiazem, Nicardipine, Verapamil
Steroid hormones:
Prednisone, Prednisolone, Methylprednisolone, Ethinylestradiol
Azole antifungal agents:
Ketoconazole, Itraconazole, Miconazole, Fluconazole, Clotrimazole
Miscellaneous:
Cimetidine, Grapefruit juice, Red wine

31, 37, 38)

Table 3 Examples of CYP3A inducers reported

Antiepileptic agent:
Phenobarbital, Carbamazepine, Phenytoin
Macrolide antibiotics:
Erythromycin, Triacetyloleandomycin
Steroid hormones:
Dexamethasone, Pregnenolone-16 α -carbonitrile
Miscellaneous:
Rifampicin, Clotrimazole

26, 31, 39-44)

Table 4 CYP3A subfamily in different species

Enzyme	Species	Enzyme	Species
CYP3A1	Rat	CYP3A13	Mouse
CYP3A2	Rat	CYP3A14	Guinea Pig
CYP3A3	Human	CYP3A15	Guinea Pig
CYP3A4	Human	CYP3A16	Mouse
CYP3A5	Human	CYP3A17	Guinea Pig
CYP3A6	Rabbit	CYP3A18	Rat
CYP3A7	Human	CYP3A20	Guinea Pig
CYP3A8	Cynomolgus Monkey	CYP3A21	Marmoset
CYP3A9	Rat	CYP3A23	Rat
CYP3A10	Hamster	CYP3A27	Rainbow Trout
CYP3A11	Mouse	CYP3A30	Fundulus Heteroclitus
CYP3A12	Dog	CYP3A31	Hamster

25)

本 論

第1章 Midazolamの全身及び肝クリアランス

Midazolamは、注射剤として麻酔前投与(筋肉内注射)や全身麻酔の導入・維持(静脈内注射)に用いられているベンゾジアゼピン誘導体である。Midazolamは国外においてはさらに経口剤としても用いられており、吸収が速やかでほぼ完全であるにも関わらず、経口投与時のbioavailabilityは10~50%と低く、またbioavailabilityの個体差も非常に大きいことが報告されている^{45, 46)}。Bioavailabilityの低い原因として、消化管及び肝でそれぞれ平均40%前後と著しい初回通過効果を受けることが挙げられる^{11, 46)}。さらに個体差の大きい原因としては、midazolam代謝に関与するCYP3Aの含量や活性の個体差が著しく、20倍以上の差があるためと考えられている。MidazolamはCYP3Aにより1'-OH midazolam及び4-OH midazolam等に酸化される^{11, 15, 28, 47)}。さらに肝のCYP3A蛋白含量とmidazolamの代謝速度間に良好な相関が認められることから、midazolamはCYP3A全般にわたる活性評価のプロープとしても用いられている^{48, 49)}。

本章ではまずmidazolamのクリアランス機構について正常時、酵素誘導時、あるいは阻害剤併用時の各条件について検討した。また、CYP3A誘導剤としてはdexamethasone及びclotrimazoleを、阻害剤としてはketoconazoleを用い、midazolamの全身クリアランス及び肝クリアランスに及ぼす影響について検討した。

Dexamethasone等のglucocorticoidによる酵素誘導は、これらが細胞質内にあるglucocorticoid receptor(GR)に結合し、この複合体を特異的に結合するglucocorticoid regulating element(GRE)を有する遺伝子の転写が促進され、蛋白が誘導されることが知られている。Tyrosine aminotransferaseはこの典型的な例である。しかしラットに発現しているCYP3A1の遺伝子はこの調節部位を持たないにもかかわらず、dexamethasoneにより誘導されることが知られている。現在までに GR阻害剤などを用いた種々の実験より、CYP3Aの誘導にはGR依存的と非依存的の両方のメカニズムが関与するものと考えられているが詳細はまだ明らかにされていない^{24, 50-54)}。

一方、ketoconazoleやitraconazoleなどのアゾール系抗真菌剤はイミダゾール基あるいはトリアゾール基を有しており、Fig.2に示したようにCYPのヘム鉄に配位することによりその活性を阻害すると考えられている^{31, 37, 55)}。その阻害機構から考える限りketoconazoleやitraconazoleは他の多くのP450分子種をも阻害すると考えられるが、CYP3Aに対する阻害作用が特に強いことが知られている³⁷⁾。

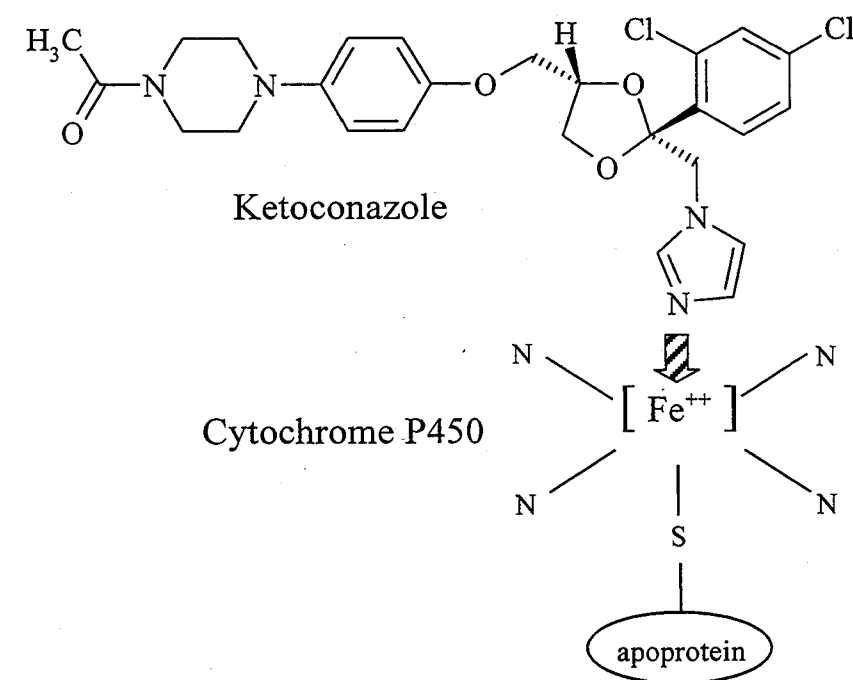


Fig.2 Inhibition mechanism of Cytochrome P450 by ketoconazole

第1節 全身クリアランス(急速単回静注)

Midazolamを投与量5, 10, 20 $\mu\text{mol/kg}$ の3水準で急速単回静注したところ、血漿中濃度推移はFig.3に示すように二相性を示した。2-コンパートメントモデルの解析法に従い、Chart 1に示した式を用い算出した血中濃度-時間曲線下面積(area under the blood concentration-time curve, AUC)及び全身クリアランス(total clearance, CL_{total})をTable 5に示した。MidazolamのAUCは投与量の増加に比例して増大し、また CL_{total} はこの投与量間でほぼ一定の値を示した。これらのことから、midazolamの血中動態はこの投与量範囲で線形性を示すことが認められた。

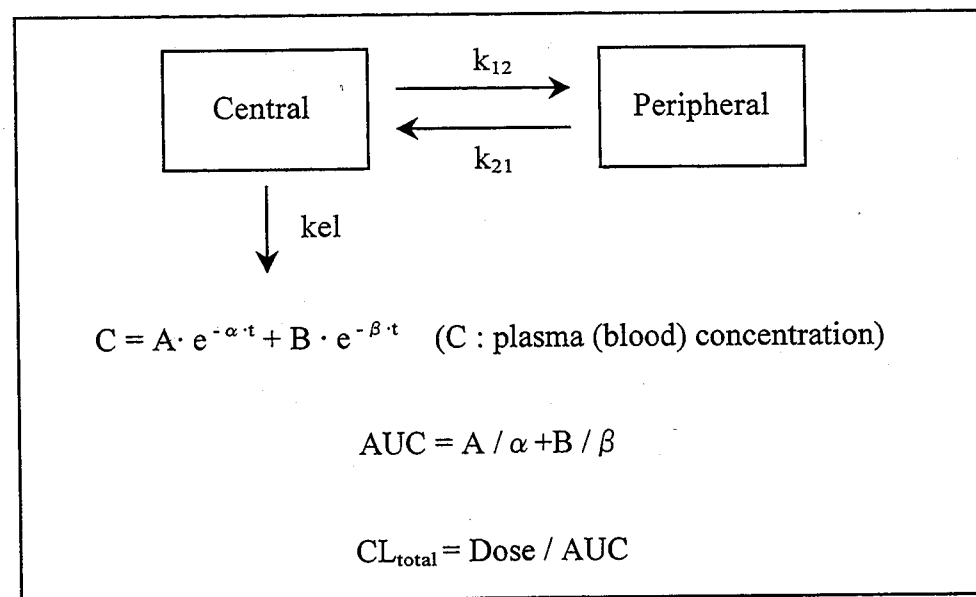


Chart 1 Two-compartment model

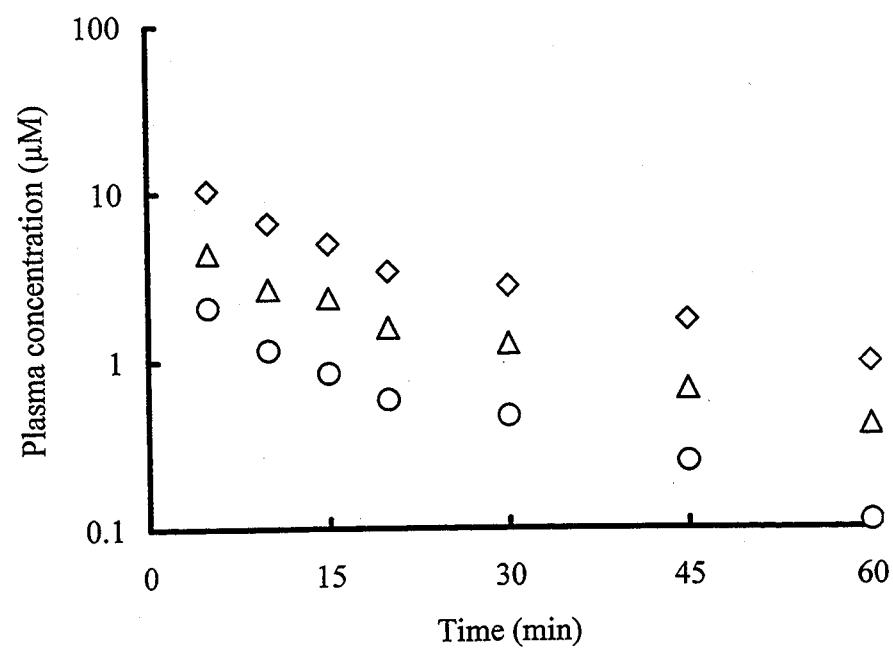


Fig.3 Plasma concentration of midazolam after intravenous administration at three doses in rats
○: 5 $\mu\text{mol/kg}$. △: 10 $\mu\text{mol/kg}$. ◇: 20 $\mu\text{mol/kg}$.
Each point represents the mean (n=3-4).

Table 5 Total plasma clearance of midazolam after intravenous administration at three doses in rats

Parameters	Dose		
	5 $\mu\text{mol/kg}$	10 $\mu\text{mol/kg}$	20 $\mu\text{mol/kg}$
AUC ($\mu\text{M}\cdot\text{min}$)	57.1 \pm 5.5	128.6 \pm 6.8	279.9 \pm 63.2
CL_{total} (ml/min/kg)	89.7 \pm 7.4	78.2 \pm 4.0	75.3 \pm 17.0

Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-4).

次に、酵素誘導剤dexamethasoneによる前処置や阻害剤ketoconazoleの同時投与の影響について検討した。KetoconazoleはヒトやラットにおいてCYP3Aを阻害することが知られている^{15, 56-58})。Dexamethasoneは50mg/dayの投与量で1日1回、2日間腹腔内投与し、2回目の投与から24時間後に実験に用いた。Midazolamの投与量は10 $\mu\text{mol/kg}$ とし、ketoconazoleは2 $\mu\text{mol/kg}$ を併用投与した。各処置ラットにおけるmidazolamの血漿中濃度推移をFig.4に、AUC及び全身クリアランスをTable 6にそれぞれ示した。未処置ラットの全身クリアランスは生理的肝血流量(45~60ml/min/kg)に比較して有意に高く、dexamethasone前処置でわずかに増加し、またketoconazole併用で有意に低下した。Dexamethasone前処置かつketoconazole併用でも未処置ラットにおける結果と同様にクリアランスは低下した。

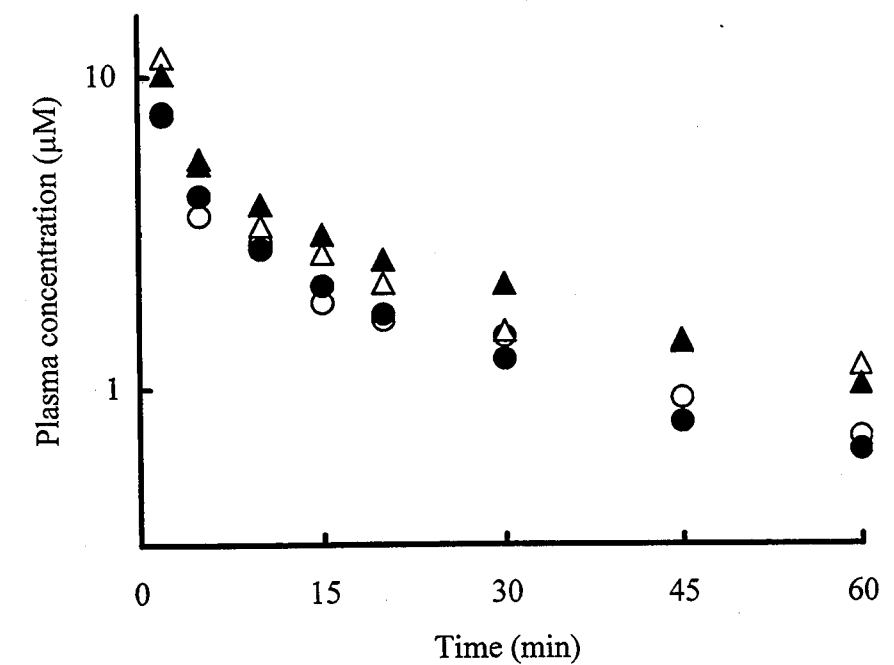


Fig.4 Plasma concentration of midazolam after intravenous administration at a dose of 10 $\mu\text{mol/kg}$ in differently treated rats
○: untreated (control). ●: DEX-pretreated.
△: with KCZ (2 $\mu\text{mol/kg}$) in untreated. ▲: with KCZ (2 $\mu\text{mol/kg}$) in DEX-pretreated.
Each point represents the mean (n=3-6).

Table 6 Total plasma clearance of midazolam after intravenous administration at a dose of 10 μ mol/kg in differently treated rats

Treatment	AUC (μ M \cdot min)	CL _{total} (ml/min/kg)
Untreated	143.9 \pm 10.9	71.6 \pm 5.5
DEX-pretreated	128.9 \pm 13.1	87.0 \pm 13.0
+ KCZ in untreated	230.1 \pm 12.8**	43.7 \pm 2.3*
+ KCZ in DEX-pretreated	215.1 \pm 24.3†	47.9 \pm 6.1

Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-6).

* Significantly different from untreated control at *p<0.05 or **p<0.01.

† Significantly different from DEX-pretreated at p<0.05.

クリアランスを生理学的モデルに従い考察する場合、血漿薬物レベルに加えて全血液薬物レベルでの薬物動態解析が重要である。血液レベルでのmidazolamの濃度推移をFig.5に、全身血液クリアランス(CL_{total})をTable 7に示した。全身血液クリアランスにおいてもその値は、生理的肝血流量(45~60ml/min/kg)と比較した場合有意に高い値を示した。実験終了後の血液を採取してmidazolamの血球分布を求めたところ、全血中濃度/血漿中濃度は0.733 \pm 0.037で、AUC、CL_{total}の変化とほぼ一致していた。全身クリアランスは通常、肝代謝クリアランス、胆汁クリアランス、腎排泄クリアランス及びその他の臓器のクリアランス等の和として表されるが、midazolamの未変化体の尿中及び胆汁排泄は投与量の1%以下であり、全身クリアランスのほとんどが代謝クリアランスによるものと考えられる。

$$CL_H = \frac{Q_H \cdot f_B \cdot CL_{int}}{Q_H + f_B \cdot CL_{int}}$$

CL_H : Hepatic clearance

CL_{int} : Hepatic intrinsic clearance

Q_H : Hepatic blood flow rate

f_B : Free fraction in blood

Under the condition of

$$f_B \cdot CL_{int} \gg Q_H, \quad CL_H \cong Q_H$$

$$f_B \cdot CL_{int} \ll Q_H, \quad CL_H \cong f_B \cdot CL_{int}$$

Chart 2 Hepatic clearance expressed by well-stirred model

Well-stirred modelでは肝クリアランスはChart 2の式で与えられ、血中midazolamの非結合形分率(f_B) \times midazolamの代謝固有クリアランス(CL_{int})が血流に比較し有意に高値を示す場合には、midazolamの肝クリアランスは血流速度に等しく、血流律速となる。しかしながら、得られた全身クリアランス値は肝の生理的血流量に比べはるかに高い値を示したことから、肝外クリアランス即ち血液中、肺、腎などでの代謝もmidazolamの全身クリアランスに関与しているものと考えられる。

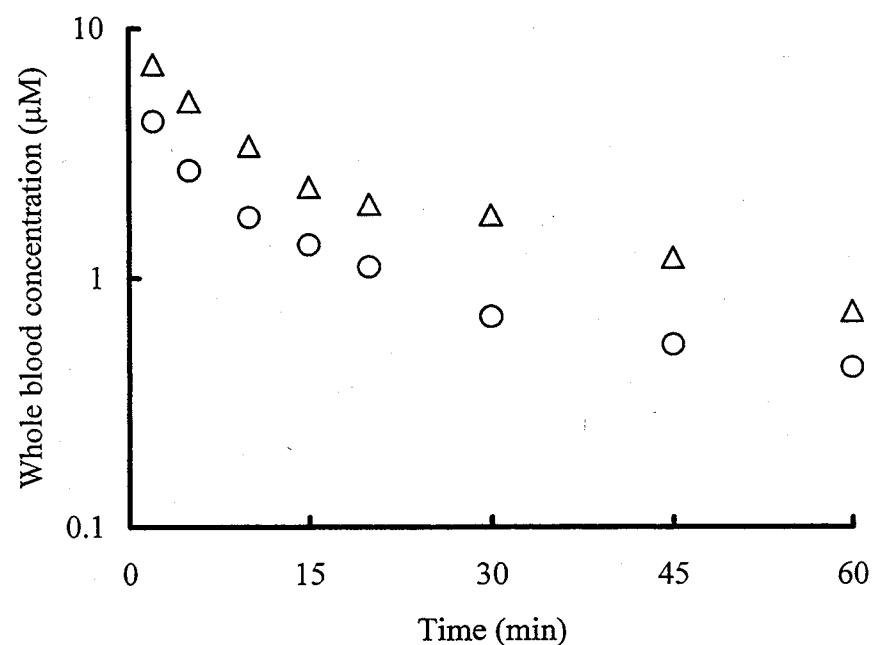


Fig.5 Concentration of midazolam in whole blood after intravenous administration at a dose of 10µmol/kg in rats
 ○: control. △: with KCZ (2µmol/kg).
 Each point represents the mean (n=3-6).

Table 7 Total blood clearance of midazolam after intravenous administration at a dose of 10µmol/kg in differently treated rats

Treatment	AUC (µM·min)	CL _{total} (ml/min/kg)
Untreated	91.7 ± 7.5	109.8 ± 9.0
+ KCZ in untreated	169.8 ± 8.3*	59.0 ± 2.9*

Each value represents the mean ± S.E. (n=3).
 * Significantly different from untreated control at p<0.05.

第2節 肝抽出率及び肝クリアランス(定速静注)

消化管(血液側)及び肝でのmidazolamの代謝を評価するため、定常状態において門脈、肝静脈、末梢動脈血漿中濃度を定量し、血液側からの消化管抽出率(ER_G)及び肝抽出率(ER_H)の算出を行った。なお、ここで求めた消化管抽出率は血液に溶存しているmidazolamが消化管組織によって抽出される割合を示すものであり、薬物吸収時の初回通過効果とは異なるものである。

本節では、末梢動脈血漿中濃度を経時的にサンプリングし、定常状態に達した後、門脈及び肝静脈血を採取した⁵⁹⁾。Chart 3の式を用いて、血液側からの消化管抽出率及び肝抽出率をそれぞれ算出した。

$$ER_G = (C_a - C_p) / C_a$$

$$ER_H = (C_p - C_v) / C_p$$

C_a: Arterial plasma concentration
 C_p: Portal venous plasma concentration
 C_v: Hepatic venous plasma concentration

Chart 3 Estimation of intestinal and hepatic extraction ratios

酵素誘導剤の影響については、dexamethasone前処置に加えclotrimazoleについても検討した。各条件下でのER_H及びER_GをFig.6、Fig.7に示した。ER_Gはいずれの条件においてもほぼ無視しうる程度の小さい値であった。ヒトにおいても、midazolam静脈内投与時の血液側からの消化管クリアランスは認められておらず、ラットでの結果と一致している⁴⁶⁾。血液側からの消化管抽出率が低い理由として、吸収時はmidazolamがすべて非結合形で細胞内へ移行するのに対し、血液側からは血中での蛋白結合のため細胞内へ移行する割合は減少することが挙げられる。さらに、CYP3Aはvillus tipに局在しており、血液側からvillus tipへの分布は極めて制限されると考えられる。それに対しER_Hは、未処置ラットにおいて86.4%と非常に高く、midazolamの肝クリアランスはほぼ肝の血流律速となっていることが示された。Dexamethasoneやclotrimazoleの前処置によりmidazolamの肝抽出率はさらに増大し、それぞれ98.4%、96.4%となった。一方 ketoconazole 併用により、肝抽出率は69.7%に低下し、dexamethasone前処置かつketoconazole併用ではdexamethasone前処置の81.3%に低下した。

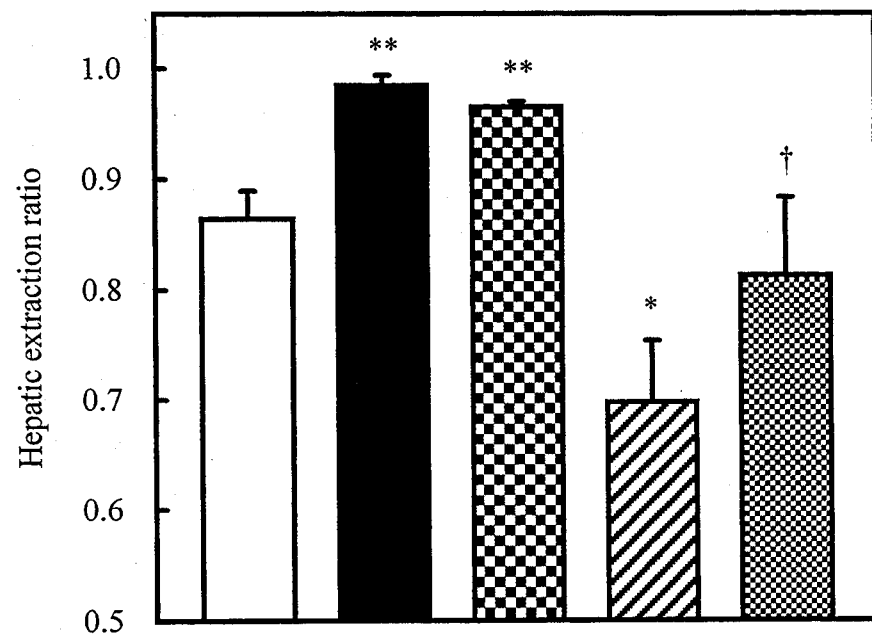


Fig.6 Hepatic extraction ratio of midazolam at a steady-state plasma concentration in differently treated rats

□ : untreated (control). ■ : DEX-pretreated.
 ▣ : CLO-pretreated. ▨ : with KCZ in untreated.
 ▤ : with KCZ in DEX-pretreated.

Each value represents the mean ± S.E. (n=3-5).

* Significantly different from untreated control at *p<0.05 or **p<0.01.

† Significantly different from DEX-pretreated at p<0.05.

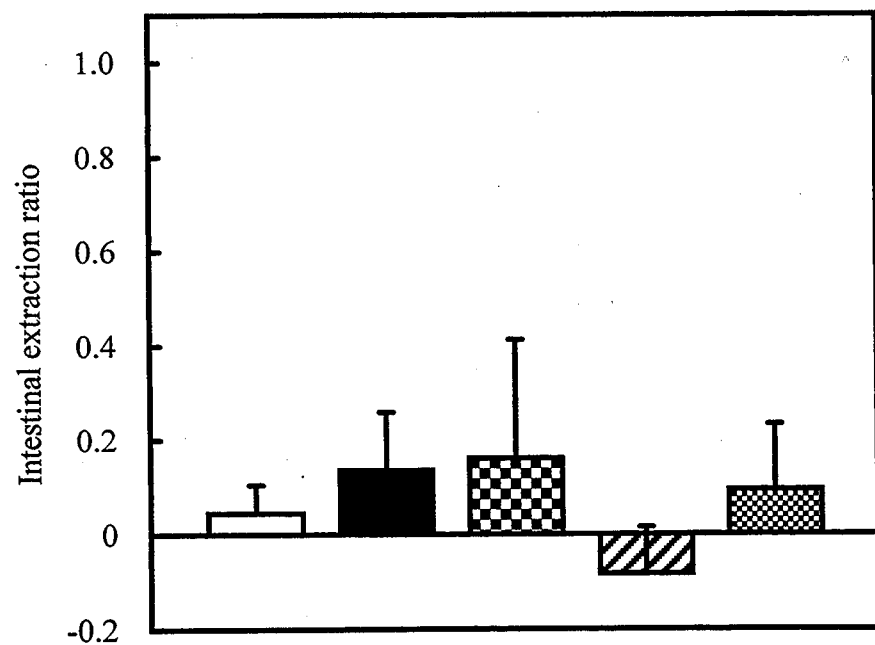


Fig.7 Intestinal extraction ratio of midazolam from blood at a steady-state plasma concentration in differently treated rats

□ : untreated (control). ■ : DEX-pretreated.
 ▣ : CLO-pretreated. ▨ : with KCZ in untreated.
 ▤ : with KCZ in DEX-pretreated.

Each value represents the mean ± S.E. (n=3-5).

肝血流量と ER_H より以下に示した式(Chart 4)を用いて肝クリアランス(CL_H)を算出し、Table 8に示した。なお、各処置ラットの肝重量(第5章 第2節参照)を用いて算出した肝血流量(Q_H)は未処置で44.2、dexamethasone前処置で58.8、clotrimazole前処置で48.4ml/min/kgであった。

以上のように、全身的なmidazolamの代謝には消化管の寄与は小さく、一方肝代謝はこれに比較し大きいことが示された。

$$CL_H = Q_H \cdot ER_H$$

$$Q_H = 0.95 \cdot \text{liver wet weight (g/kg)}$$

Chart 4 Estimation of hepatic clearance and hepatic blood flow rate⁶⁰⁾

Table 8 Hepatic clearance of midazolam under a steady-state condition in differently treated rats

Treatment	CL_H (ml/min/kg)
Untreated	38.2 ± 1.1
DEX-pretreated	57.9 ± 0.6**
CLO-pretreated	46.7 ± 0.2**
+ KCZ in untreated	30.8 ± 2.5*
+ KCZ in DEX-pretreated	47.8 ± 4.1†

Each value represents the mean ± S.E. (n=3-7).

* Significantly different from untreated control at *p<0.05 or **p<0.01.

† Significantly different from DEX-pretreated at p<0.05.

本章の実験により以下の知見が得られた。

- 1) Midazolamを5, 10, 20 μ mol/kgの投与量で単回静注したところ、その全身クリアランスに変動はなく、AUCは投与量に比例し増大した。このことから、この投与量範囲でmidazolamの血中動態は線形性を示すことが明らかとなった。血漿中動態に線形性が認められたのは、肝クリアランスが血流律速であることもその一因と考えられる。
- 2) Midazolamの全身血液クリアランスは約110ml/min/kgであり、肝血流量よりも有意に高いことから、midazolamの全身クリアランスには肝外クリアランスも関与することが示された。
- 3) Dexamethasone前処置によりmidazolamの全身クリアランスはわずかに増加傾向を示し、一方ketoconazole併用により有意に減少した。Dexamethasone前処置の影響がわずかであるのは、未処置ラットにおいてもmidazolamの肝クリアランスは既に血流律速となっているためと考えられる。
- 4) 定常状態時、未処置ラットのmidazolam肝抽出率は0.864と非常に高く、肝血流律速であることが示された。Dexamethasone前処置、clotrimazole前処置により、肝抽出率はさらに増大し、ketoconazole併用で有意に減少した。
- 5) Midazolamの血液側からの消化管クリアランスは正常時及び酵素誘導時においても無視できる程度であった。

薬物相互作用は、吸収、代謝、分布、排泄のいずれの過程においても生じる可能性があるが、吸収時の相互作用の機構としては、消化管での溶解性や安定性など薬物溶出性への影響、gastric emptying time(GET)変化など消化管内滞留性の変動による吸収変動、及び特殊輸送系(吸収方向、排出方向)の競合などが知られている。近年ATP依存的な細胞外排出ポンプとしてP-gpの重要性及びそれに関わる相互作用が注目されている。特に、多くのCYP3A基質とP-gp基質がオーバーラップしていることから、CYP3A基質の動態を考える上で、P-gpの働きを考慮に入れる必要がある^{24, 61, 62}。しかしmidazolamはP-gp機能に影響は及ぼすもののP-gpの基質ではないことを、既に当教室で明らかにしている⁶³。CYP3Aの基質となる薬物を経口投与した場合、消化管や肝などで初回通過効果を受けるが、特に、初回通過効果が著しい薬物で代謝阻害が生じると、場合によっては血漿中濃度が数倍から数十倍にも増大する。

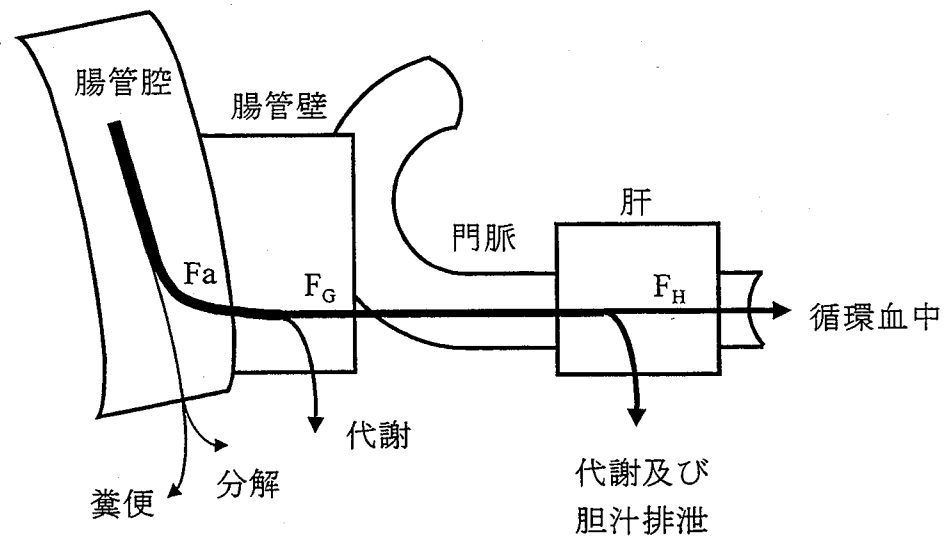
近年、グレープフルーツジュース中の種々の成分が消化管上皮細胞内のCYP3A蛋白を減少させ、CYP3A活性を低下させることが明らかとなり、数多くの薬物との相互作用が報告されている^{15, 64-68}。Lovastatinのように、薬物によってはAUCが約20倍にも増大した例もある⁶⁹。また、抗アレルギー薬として用いられるterfenadineは活性体である酸性代謝物のプロドラッグであり、本来経口投与時に未変化体が血漿中に出現することはないが、グレープフルーツジュースとの併用により、QT間隔延長の副作用を持つ未変化体の血漿中濃度が上昇し、死亡した例も報告されている^{31, 70}。また、CYP3A誘導剤であるrifampicinを連続投与した場合CYP3Aが著しく誘導され、midazolamの経口投与時のAUCは約1/24に低下した例が報告されている⁷¹。即ち、前述の酵素阻害と、酵素誘導の可能性を併せて考えると、約500倍ものbioavailabilityの変動が生じることになる。このように、消化管の吸収過程のみにおいても数多くの薬物相互作用が報告されている。

本章では各種酵素誘導剤や阻害剤ketoconazoleを用いて、midazolamの吸収過程、特に消化管初回通過効果の観点から薬物相互作用を検討した。さらにその初回通過効果を消化管と肝で分離して評価することを試みた。初回通過効果とbioavailabilityの関係をFig.8に示した。この図で明らかのように、薬物吸収時の消化管や肝における初回通過効果の程度や変動は、薬物のbioavailabilityを決定する重要な因子と言える。

第1節 Bioavailabilityに及ぼすラット週齢の影響(空腸ループ内投与)

酵素誘導に及ぼすラットの週齢の影響について検討した。ラットではCYP3A発現に週齢差や性差があり、CYP3A2は雌の成熟ラットでは消失し、CYP3A9は7週齢から発現することが報告されている^{26, 42)}。また、誘導効果も週齢により影響を受け、ラットの週齢が少ないほど誘導効果が大きいという報告や未成熟ラットと成熟ラットにおいては誘導に時間的な差があるという報告がある^{50, 72)}。一方ヒトでは、CYP3A7は胎児に特異的であるが、肝のCYP3A活性は加齢による影響はなく、性差としては女性の方が約20%活性が高いことなどが報告されている²⁹⁾。

本節では6~7週齢と8~9週齢の雄性ラットを用い、midazolamのbioavailability及び酵素誘導剤 dexamethasoneの影響について検討した。小腸のCYP3Aは十二指腸から空腸など小腸上部に多く発現していることが知られているため、midazolamの投与部位としては空腸上部を用いた^{14, 73, 74)}。Fig.9、Table 9に示すように、未処置ラットにおいては6~7週齢の方がmidazolamのAUCが約6倍高く、また値のばらつきが非常に大きかった。一方dexamethasone前処置の影響は両週齢間で認められ、bioavailabilityは同程度まで低下した。また、この時midazolamの腸管ループ内残存量には両週齢間で差はなく、AUCの変動は代謝活性の違いによるものと考えられる。即ち、6~7週齢では未処置ラットにおいてCYP3Aの発現が不十分かつ不安定であり、消化管や肝における初回通過効果の割合が低かったためと考えられる。以上の結果より、CYP3Aの発現が安定していると思われる8~9週齢のラットを本節以外のすべての実験に用いることとした。



$$\begin{aligned} \text{Bioavailability} &= \text{AUC}_{\text{p.o.}} / \text{AUC}_{\text{i.v.}} \text{ (Dose}_{\text{p.o.}} = \text{Dose}_{\text{i.v.}} \text{の時)} \\ &= \text{Fa} \cdot \text{F}_G \cdot \text{F}_H \\ &= \text{Fa} \cdot (1 - \text{ER}_{\text{G, abs}}) \cdot (1 - \text{ER}_H) \end{aligned}$$

- AUC_{p.o.} : AUC after oral administration
- AUC_{i.v.} : AUC after intravenous administration
- Fa : Absorption ratio
- F_G : Intestinal availability
- F_H : Hepatic availability
- ER_{G, abs} : Intestinal extraction ratio during absorption
- ER_H : Hepatic extraction ratio

Fig.8 Estimation of oral bioavailability and the first-pass effects

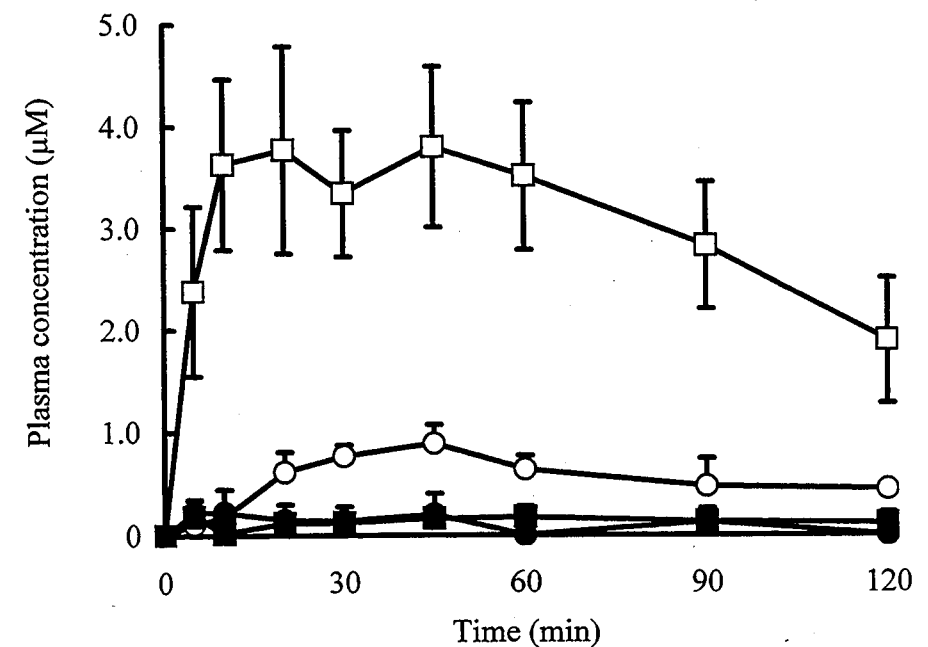


Fig.9 Plasma concentration of midazolam after intrajejunal administration at a dose of 10µmol in untreated or DEX-pretreated rats

- : untreated 8~9weeks.
 - : DEX-pretreated 8~9weeks.
 - : untreated 6~7weeks.
 - : DEX-pretreated 6~7weeks.
- Each point represents mean ± S.E. (n=3-5).

Table 9 Effect of rat age on plasma AUC of midazolam after intrajejunal administration

	AUC ($\mu\text{M}\cdot\text{min}$)	
	8~9weeks	6~7weeks
Untreated	63.6 \pm 11.0	368.0 \pm 78.7**
DEX-pretreated	12.9 \pm 1.9	13.1 \pm 6.6

The dose of midazolam was 10 μmol .
 Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-5).
 **Significantly different from 8~9weeks at p<0.01.

第2節 Bioavailabilityに及ぼす各種酵素誘導剤の影響(空腸ループ内投与)

8~9週齢ラットに、酵素誘導剤として知られる clotrimazole、phenobarbital、pregnenolone 16 α -carbonitrile及びdexamethasoneを前処置し、midazolamのbioavailabilityに及ぼす影響を比較した^{40, 41, 52, 53, 75}。なお、各誘導剤の投与量については文献値を参考にした。

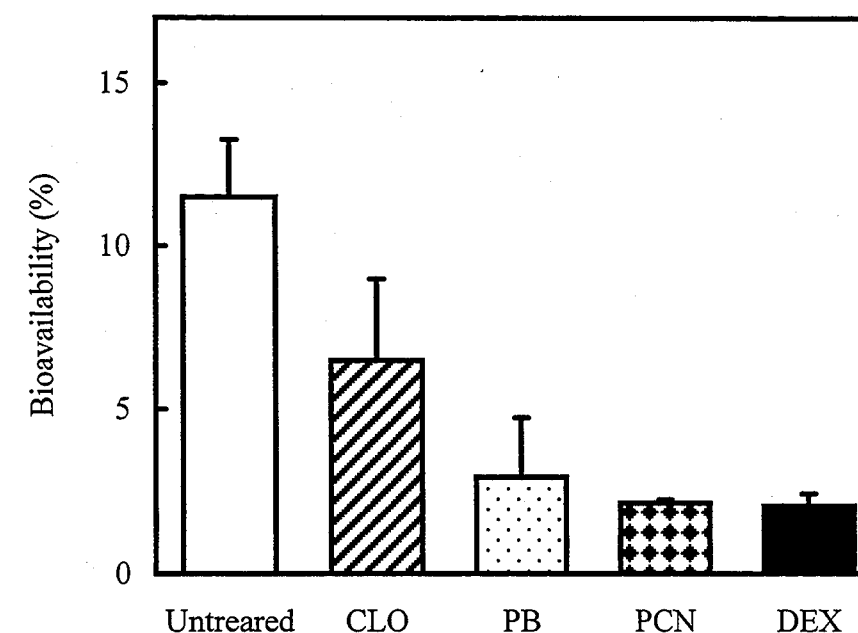


Fig.10 Decreased oral bioavailability of midazolam at a dose of 10 μmol in differently treated rats
 Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-5).

Fig.10に示したように、いずれの誘導剤によってもmidazolamの経口bioavailabilityは低下した。消化管内残存量はいずれも投与量の10%程度であり、bioavailabilityの低下は初回通過代謝の亢進、即ちCYP3A活性の増大のためと考えられる。各誘導剤前処置によるCYP3A誘導効果は、dexamethasone, pregnenolone 16 α -carbonitrile > phenobarbital > clotrimazoleの順であった。以下、誘導剤としては主にdexamethasone及びclotrimazoleを用い実験を行った。

第3節 Bioavailabilityに及ぼすKetoconazoleの影響(空腸ループ内投与)

Dexamethasone前処置、ketoconazole併用、及びdexamethasone前処置にさらにketoconazole併用の3群でmidazolamのbioavailabilityに及ぼす影響について検討した(Fig.11、Fig.12)。血漿midazolamのAUCは台形法により120minまでを算出した。なお、いずれのラットにおいても、投与後120minでの消化管内midazolam残存量は投与量の約10%程度であり、消化管吸収率(Fa)には各処置間で差がないことが認められた。Midazolamのbioavailabilityは未処置ラットにおいても11.5%と低く、ヒトでの報告値(12~50%、平均30%)よりも初回通過効果が高いという傾向が観察された⁴⁶⁾。Midazolamのbioavailabilityはdexamethasone前処置により約1/5に低下し、一方ketoconazole併用により約5倍と著しく増大した。また、dexamethasone前処置にさらにketoconazoleを併用したラットにおいてはdexamethasone前処置のみに比較しbioavailabilityは約3.5倍に増加した。ヒトではketoconazoleの4日間投与によりmidazolam経口投与時のAUCが10倍以上に増大したという報告や、rifampicinの5日間投与により約1/24に減少したという報告があり、程度の差はあるものの、midazolam代謝に関わる薬物相互作用はラットにおいても検出されるものと考えられた^{57,71)}。

なお、本節で得られたmidazolamのbioavailabilityの変動には、肝または消化管あるいは両部位における初回通過効果の変動が関与しているものと考えられる。そこで次節で、これら両部位における初回通過効果の変動をそれぞれ分離評価することを試みた。

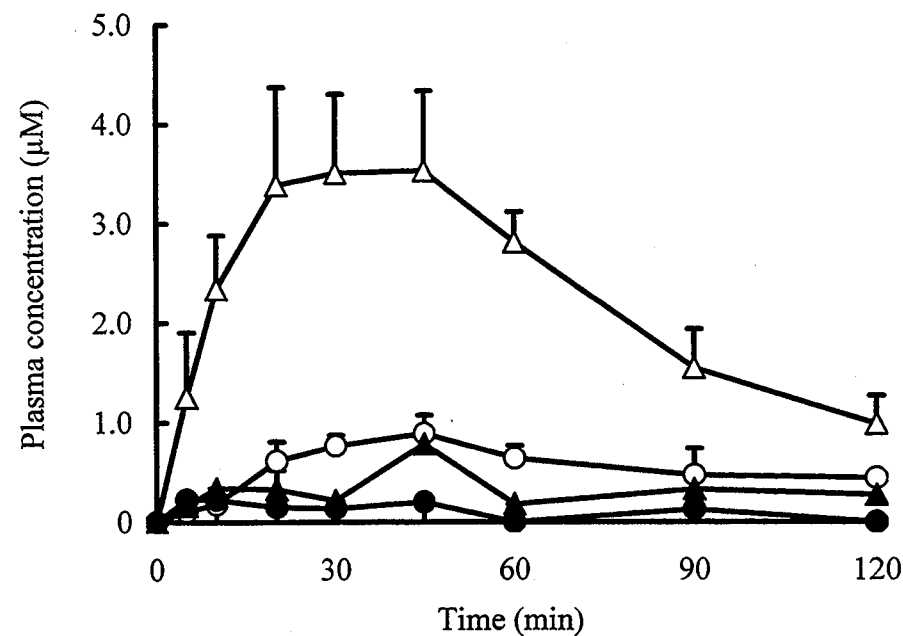


Fig.11 Plasma concentration of midazolam after intrajejunal administration at a dose of 10µmol in differently treated rats

○ : untreated. ● : DEX-pretreated.
 △ : with KCZ (2µmol) in untreated. ▲ : with KCZ (2µmol) in DEX-pretreated.
 Each point represents the mean ± S.E. (n=3-5).

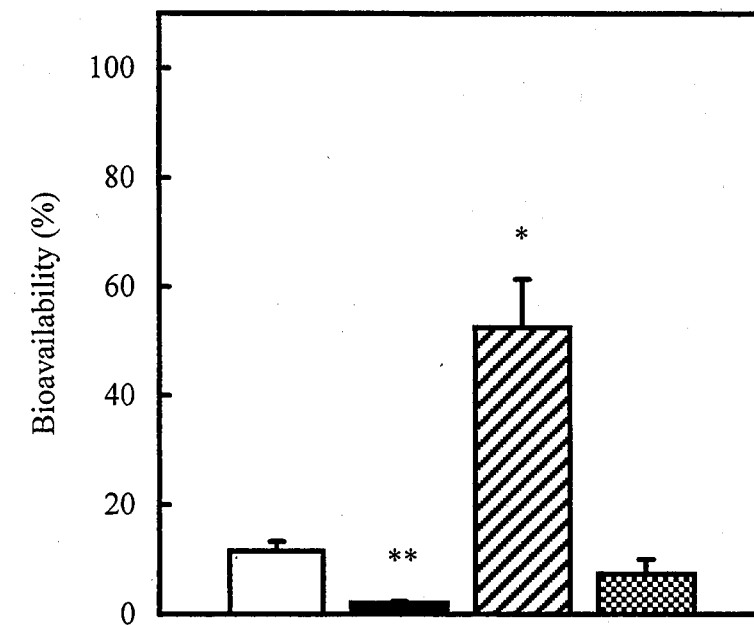


Fig.12 Bioavailability of midazolam after intrajejunal administration at a dose of 10µmol in differently treated rats

□ : untreated. ■ : DEX-pretreated.
 ▨ : with KCZ (2µmol) in untreated. ▩ : with KCZ (2µmol) in DEX-pretreated.
 Each value represents the mean ± S.E. (n=3-5).
 * Significantly different from untreated control at *p<0.05 or **p<0.01.

第4節 消化管初回通過効果(In situ腸管ループ全血回収法)

臨床で問題となる薬物相互作用には消化管のみで生じるものもあり、これを予測するためには肝と消化管の初回通過効果を分離して評価する必要がある。そこで次にin situ腸管ループ全血回収法^{76, 77)}により消化管初回通過効果の算出を試みた。

In situ腸管ループ全血回収法とは実験の部のFig.41に示したように、空腸上部にループを作成して薬液を投与し、ループに付属する血管を通過する全ての腸間膜静脈血を回収する方法である。本法を用いることで肝の影響を除外し、薬物透過時の消化管膜内代謝のみを測定できる。本実験では、失血による動態変化を防ぐために新鮮血を股静脈より0.38ml/minで輸血した。Fig.13にin situ腸管ループ全血回収法を行った際の経時的な腸間膜静脈血流速度を示した。血流速度は約0.38ml/minとほぼ一定に保たれており、輸血速度の妥当性が示された。また、酵素誘導剤であるdexamethasone前処置やCYP3A阻害剤ketoconazoleを併用したラットにおいても、血流速度は一定の値を示した。

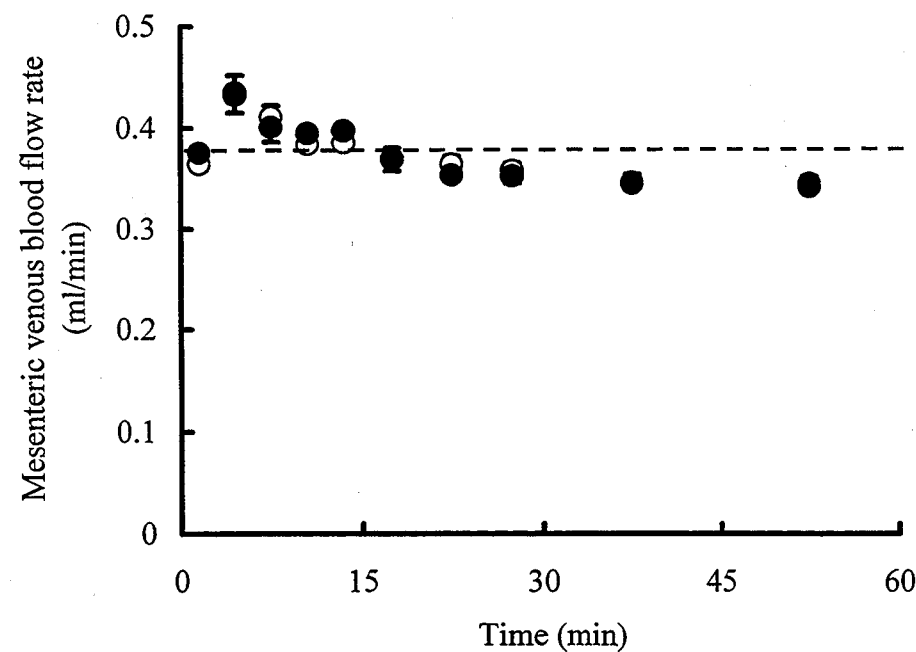


Fig.13 Observed mesenteric venous blood flow rate under a constant blood transfusion in rats
○: untreated. ●: DEX-pretreated.
Each point represents the mean ± S.E. (n=6-7).

まず消化管におけるmidazolam代謝の投与量依存性について検討した。腸管ループ内に0.05μmol/mlあるいは0.5μmol/mlの薬液を1ml投与後、腸間膜静脈血中へのmidazolamの出現速度及び腸間膜静脈血中累積midazolam量をそれぞれFig.14、Fig.15に示した。またこの時腸間膜静脈血漿中濃度と血中濃度/血漿中濃度比(0.733、第1章 第1節参照)から血中レベルでの算出を行った。さらに、ループ内残存量、腸組織内残存量の定量を行い、回収率で消化管残存薬物量の補正を行った。計算方法を以下に示す(Chart 5)。

$$\text{Absorption ratio (Fa)} = 1 - \text{unabsorbed amount} / \text{dose}$$

$$\text{Intestinal availability (F}_G\text{)} = \frac{\text{Cumulative amount in mesenteric venous blood}}{\text{(dose - unabsorbed amount)}}$$

Chart 5 Estimation of intestinal first-pass effect

Fig.15は吸収された薬物のうち未変化体として腸間膜静脈血中に出現した薬物量を吸収量(投与量 - 残存量)で除したもので、消化管のavailability(Fa)を示す(Chart 5)。即ち、100%との差が消化管初回通過効果により減少した割合となる。低投与量(0.05μmol)時、dexamethasone前処置により血中累積量は未処置ラットの68.5%にまで減少したことから、dexamethasone前処置により消化管のCYP3Aが誘導され、代謝が亢進していることが確認された。また投与量を10倍(0.5μmol)に増加させたところ、腸間膜静脈血中へのmidazolam出現速度及び累積透過量は増大した。ラットの消化管のCYP3A含量及び活性は肝と比較して少ないことが報告されており、高投与量による消化管初回通過効果の低下は代謝が飽和したためと考えられる^{14, 46, 73)}。空腸ループ内投与の結果(第3節)より、midazolamの吸収過程において消化管及び肝のいずれか、またはその両方で初回通過効果を受けるものと考えられるが、Fig.15に示すように、消化管における初回通過効果が関与していることが明らかとなった。

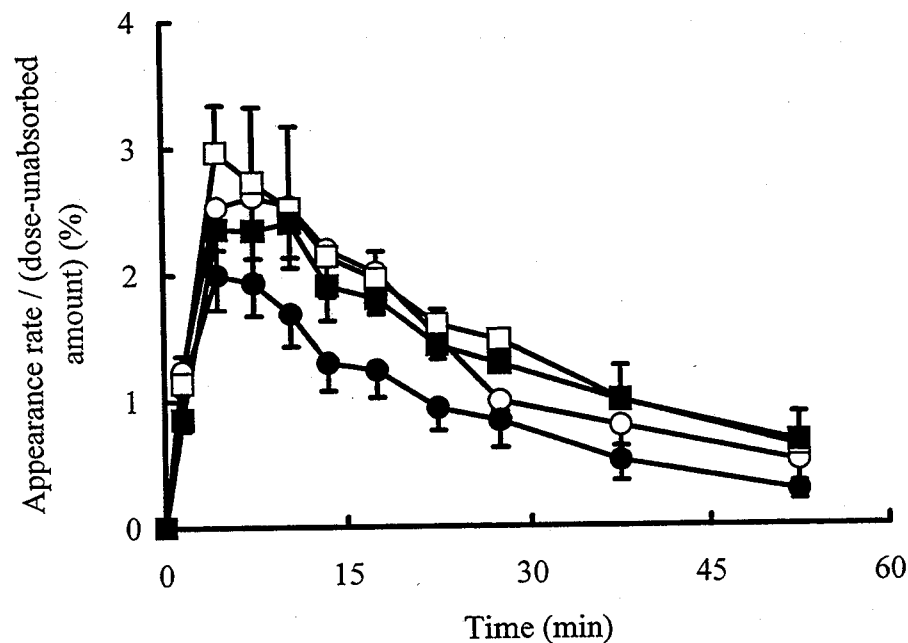


Fig. 14 Appearance rate of midazolam in mesenteric venous blood after intrajejunal administration at two doses in differently treated rats
 ○: untreated (0.05 μmol) ●: DEX-pretreated (0.05 μmol).
 □: untreated (0.5 μmol) ■: DEX-pretreated (0.5 μmol).
 Each point represents the mean ± S.E. (n=3-5).

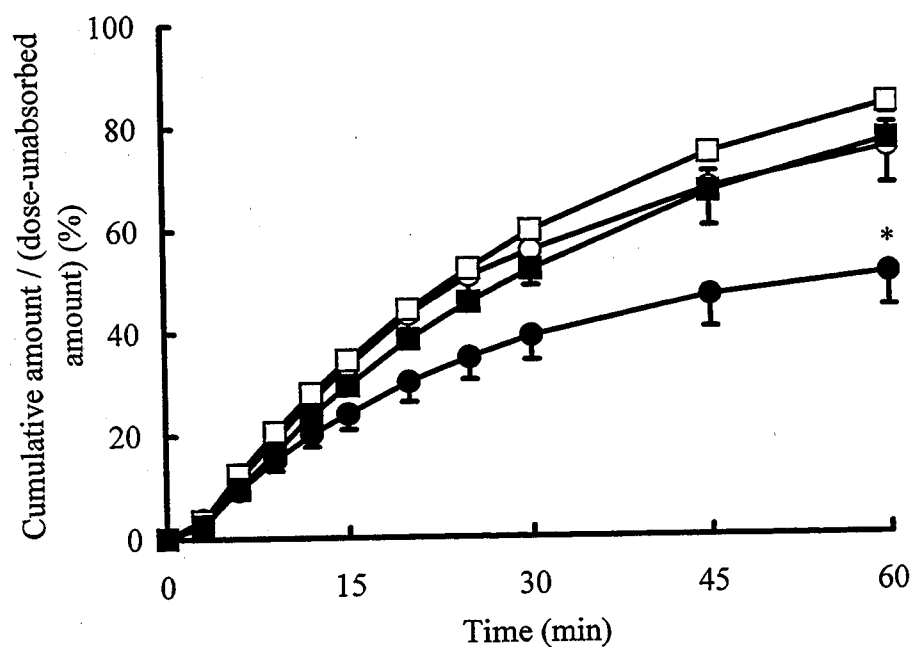


Fig. 15 Time course of midazolam recovery in mesenteric venous blood after intrajejunal administration at two doses in differently treated rats
 ○: untreated (0.05 μmol) ●: DEX-pretreated (0.05 μmol).
 □: untreated (0.5 μmol) ■: DEX-pretreated (0.5 μmol).
 Each point represents the mean ± S.E. (n=3-5).
 * Significantly different from low dose (0.05 μmol) at p<0.05.

次に、低投与量(0.05 μmol)時において、ketoconazole併用の影響について検討した。Midazolamの腸間膜静脈血中への出現速度をFig.16に、累積透過量をFig.17に示した。また、各処置ラットにおける血中への回収率及び全回収量を比較した(Fig.18)。未処置ラットにおいてketoconazole併用によりmidazolamの腸間膜静脈血中回収量及び全回収量がわずかに増加しており、これは吸収過程における代謝がketoconazoleにより阻害されたためと考えられる。しかしながら、両者間に有意差はなく、未処置ラットの消化管におけるmidazolam代謝はかなり低いものと考えられる。ラット消化管ではdexamethasoneなどの酵素誘導剤を用いた時、CYP3A1が誘導されることが示されているが、未処置ラットではほとんど検出されておらず、今回の結果と一致する知見と考えられる^{41, 42, 74}。

一方、dexamethasone前処置ラットで観察された消化管初回通過効果が、ketoconazole併用により顕著に低下したことから、dexamethasone前処置により消化管で誘導されたCYP3Aが阻害されたものと考えられる。データには示していないが、dexamethasone前処置ラットにおいてCYP阻害剤であるomeprazoleを併用した場合も累積midazolam量は増加した。

以上示したように、空腸ループ内投与(本章 第3節参照)時の初回通過効果及び酵素誘導剤や阻害剤併用時のbioavailability変動に、消化管初回通過効果の変動が寄与していることが示された。しかしヒトでは肝と消化管の初回通過効果が同等であるのに比べ、ラットでは消化管より肝初回通過効果の方が著しく高いことが明らかとなった⁴⁶。

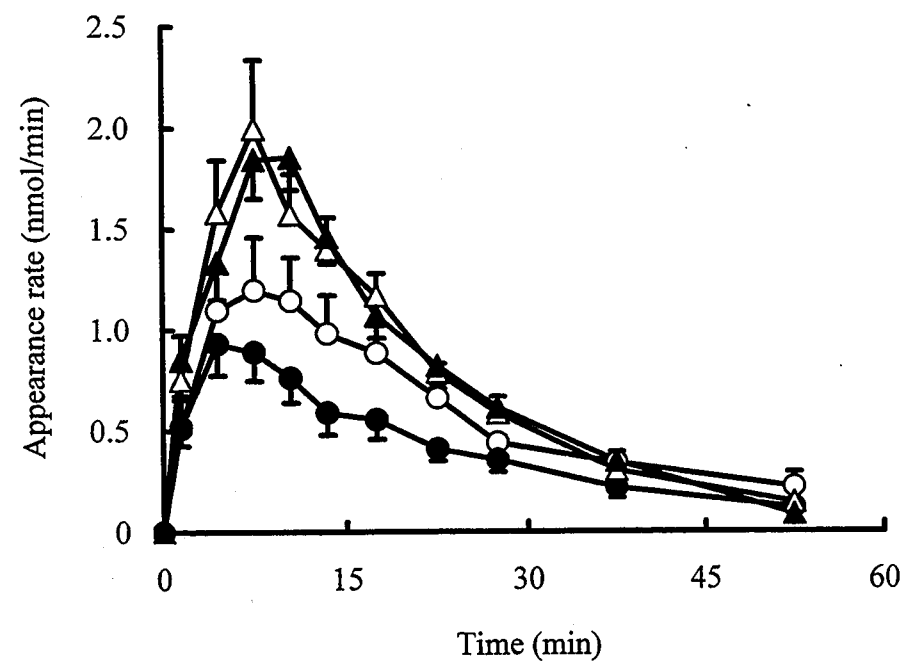


Fig. 16 Appearance rate of midazolam in mesenteric venous blood after intrajejunal administration at a dose of 0.05 μmol in differently treated rats
 ○: untreated. ●: DEX-pretreated.
 △: with KCZ (0.5 μmol) in untreated. ▲: with KCZ (0.5 μmol) in DEX-pretreated.
 Each point represents the mean ± S.E. (n=5-6).

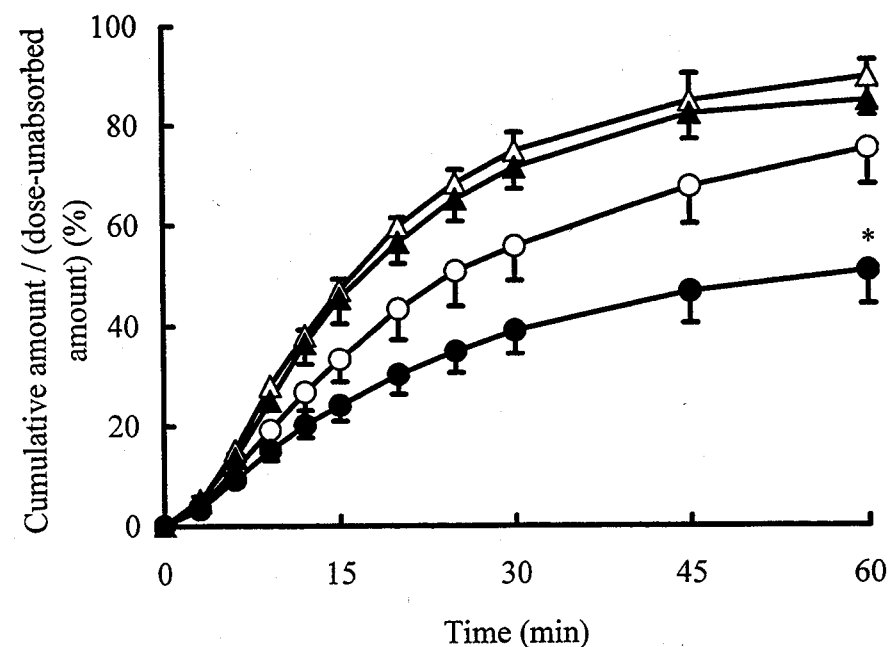


Fig.17 Time course of midazolam recovery in mesenteric venous blood after intrajejunal administration at a dose of $0.05\mu\text{mol}$ in differently treated rats
 ○: untreated. ●: DEX-pretreated.
 △: with KCZ ($0.5\mu\text{mol}$) in untreated. ▲: with KCZ ($0.5\mu\text{mol}$) in DEX-pretreated.
 Each point represents the mean \pm S.E. (n=5-6).
 * Significantly different from untreated control at $p<0.05$.

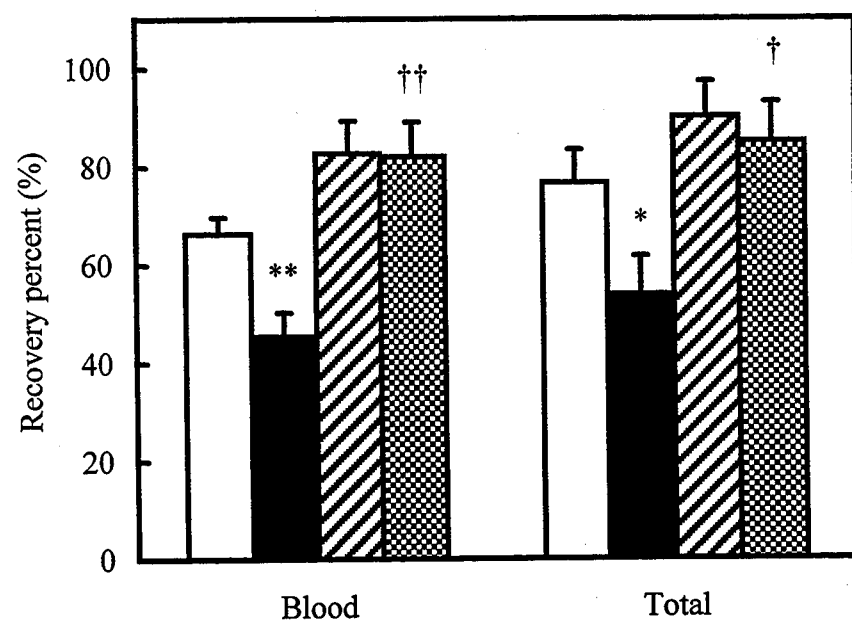


Fig.18 Recovery of midazolam from mesenteric venous blood (Blood) and loop (Total) after intrajejunal administration at a dose of $0.05\mu\text{mol}$ in differently treated rats
 □: untreated. ■: DEX-pretreated.
 ▨: with KCZ ($0.5\mu\text{mol}$) in untreated. ▩: with KCZ ($0.5\mu\text{mol}$) in DEX-pretreated.
 Each value represents the mean \pm S.E. (n=5-6).
 * Significantly different from untreated control at $*p<0.05$ or $**p<0.01$.
 † Significantly different from DEX-pretreated at $\dagger p<0.05$ or $\dagger\dagger p<0.01$.

第5節 In vitro消化管代謝

前節で、未処置ラットにおいてmidazolamのラット消化管初回通過効果がわずかながら認められ、dexamethasone前処置によりその程度が増加することが明らかとなった。本節では小腸ミクロソームを調製し、in vitroでCYP3A活性を測定した。Fig.19、Fig.20に示したように、midazolamの代謝活性はdexamethasone前処置により約2倍に増大した。しかしながら、dexamethasone前処置時においても V_{max} は約 $0.3\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ proteinであり、未処置ラットの肝ミクロソームでの V_{max} 約 $2.7\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein(第5章 第1節 Table 12参照)に比較して著しく低いことが示された。

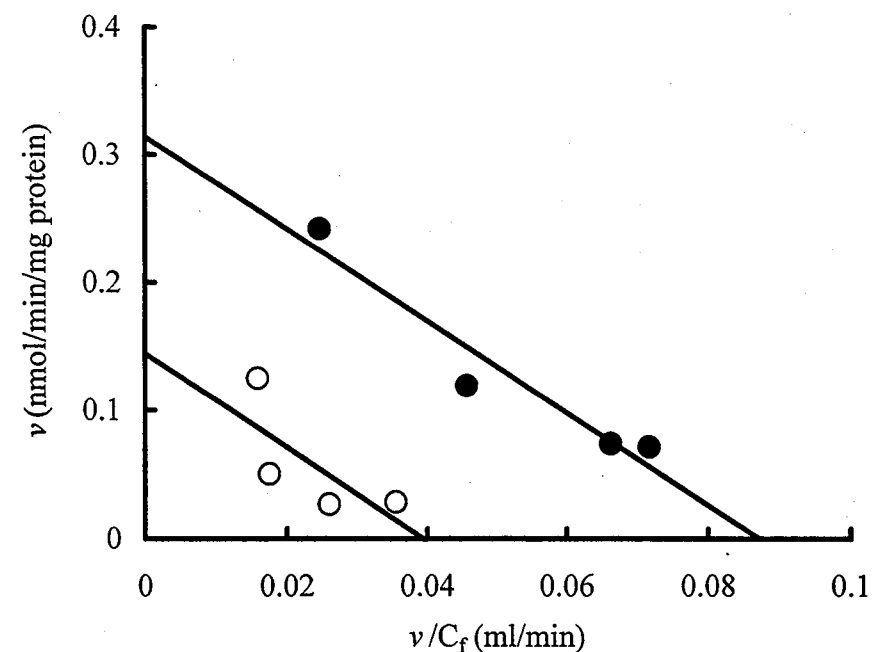


Fig.19 Eadie-Hofstee plot of midazolam metabolism in the intestinal microsomes
 ○: untreated. ●: DEX-pretreated.

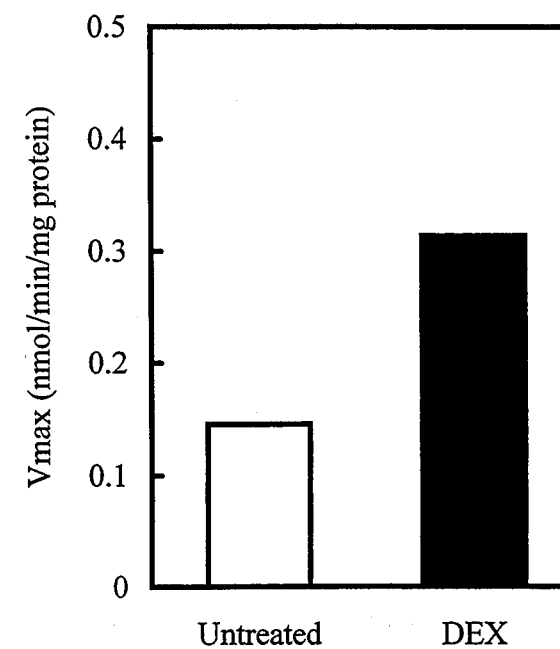


Fig.20 Maximal metabolic rate of midazolam (V_{max}) in the intestinal microsomes

Midazolamの吸収動態について検討した結果、以下の知見が得られた。

- 1) ラットにおけるCYP3A活性は、週齢により影響を受けることが示唆された。即ち8~9週齢のラットに比べ、7週齢未満のラットではCYP3Aの発現が安定していないことが認められた。
- 2) 各酵素誘導剤によるCYP3Aの誘導効果は、dexamethasone, pregnenolone 16 α -carbonitrile > phenobarbital > clotrimazoleの順であった。
- 3) Midazolamを空腸ループ内投与した時のbioavailabilityは、吸収が良好であるにも関わらず約11.5%であり、初回通過効果が著しいことが示された。Dexamethasone前処置によりbioavailabilityは未処置ラットの1/5に低下し、ketoconazole併用により約5倍に増大した。
- 4) In situ腸管ループ全血回収法によりmidazolamの消化管代謝を検討したところ、未処置ラットにおいては代謝がわずかであるが、dexamethasone前処置によりこの代謝は増大し、消化管初回通過効果は約50%となった。未処置ラット、dexamethasone前処置ラットにおける初回通過効果は、ketoconazoleの併用により有意に低下した。
- 5) In vitro小腸マイクロソームを用いたmidazolam代謝実験で、未処置ラットにおいて代謝活性が確認され、dexamethasone前処置により活性は約2倍に増大した。しかしながら、肝に比較してそのVmaxは著しく低いことも認められた。

Erythromycinはマクロライド系抗生物質であり、しばしば薬物相互作用で問題になる薬物であるが、通常erythromycin自身の体内動態変化は少なく、むしろ阻害剤として働くことが多い。Erythromycinはその代謝物がCYP3Aのヘム鉄と安定な複合体(metabolic intermediate complex, MI complex)を形成し酵素を不活化する(Fig.21)^{31, 37, 55, 78, 79}。そのために、酵素が新しく産生されるまでCYP3A活性は回復せず、erythromycinの連続投与によりCYP3A基質の代謝は低下し、bioavailabilityは著しく増大することが知られている⁸⁰。

ErythromycinはCYP3AによりN-demethylationを受けるが、このメチルの炭素がCO₂となって呼気中に排出されることから、N-メチルを¹⁴Cで標識したerythromycinを静脈内投与し、呼気中の¹⁴CO₂を定量することにより各個人のCYP3A活性を評価する方法、即ちerythromycin breath test(ERMBT)が海外で用いられている⁸¹。このERMBTと、種々のCYP3A薬物の代謝活性との相関が検討され、いくつかの薬物については良好な結果が得られているが、静脈内投与したerythromycinはほとんど肝のCYP3Aで代謝されるのに対し、経口投与された薬物は消化管での初回通過効果も受けるなど、投与方法によっては一致しない場合が多い^{35, 47, 82-84}。また投与経路だけの問題ではなく、CYP3Aにはヒトで数種の分子種が知られているが、その体内分布や基質特異性に差があり、薬物によっては静脈内投与でも相関が得られない一因となっている^{82, 84-88}。

本章では、midazolamと並んで代表的なCYP3A基質であるerythromycinについて、ラットにおけるbioavailability及び消化管初回通過効果に及ぼすdexamethasone前処置やmidazolam併用の影響について検討した。

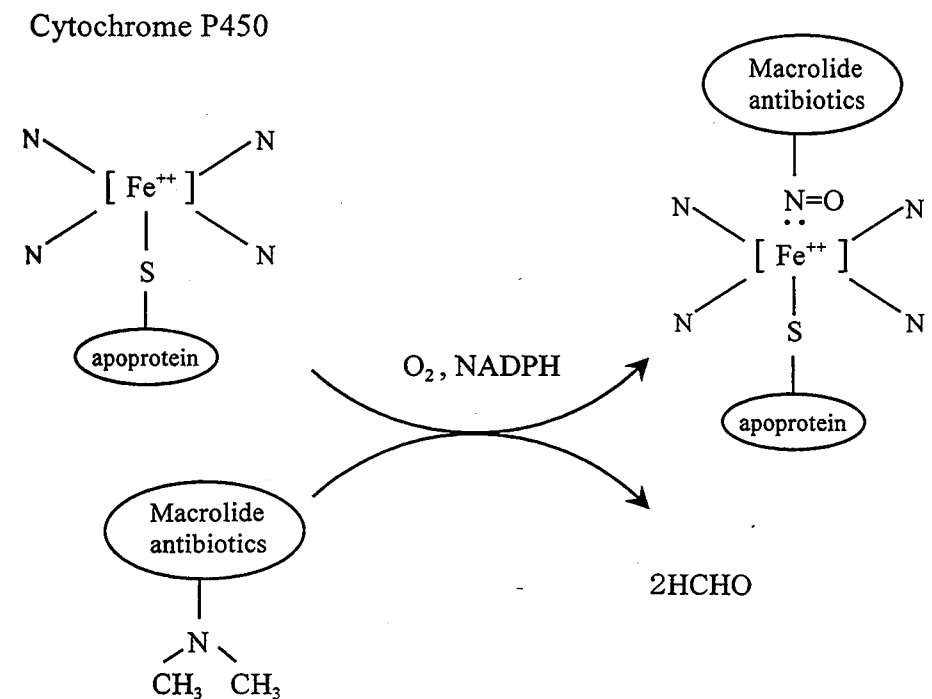


Fig.21 Inhibition of cytochrome P450 by macrolide antibiotics

第1節 Bioavailabilityに及ぼすDexamethasone及びMidazolamの影響(空腸ループ内投与)

Dexamethasoneの前処置はmidazolamの場合と同様に、50mg/rat/dayで2日間腹腔内投与した。またCYP3A基質midazolamの影響を検討するために、erythromycinと併用し空腸ループ内に併用投与した。Dexamethasone前処置によりerythromycinの末梢循環血漿中濃度は有意に減少し、一方midazolam(10 μ mol)の併用により増加した(Fig.22)。Dexamethasone前処置によりAUCは有意に低下したことから、CYP3Aが誘導されて消化管か肝、あるいはその両者におけるerythromycinの代謝が亢進したことが示唆された(Fig.23)。Midazolamのbioavailabilityはerythromycin併用により増大することが知られている⁸⁹⁾。本節では逆にerythromycinのbioavailabilityに及ぼすmidazolamの影響について検討したところ、erythromycinのbioavailabilityは増加し、erythromycinとmidazolamは相互に影響し合うことが観察された。

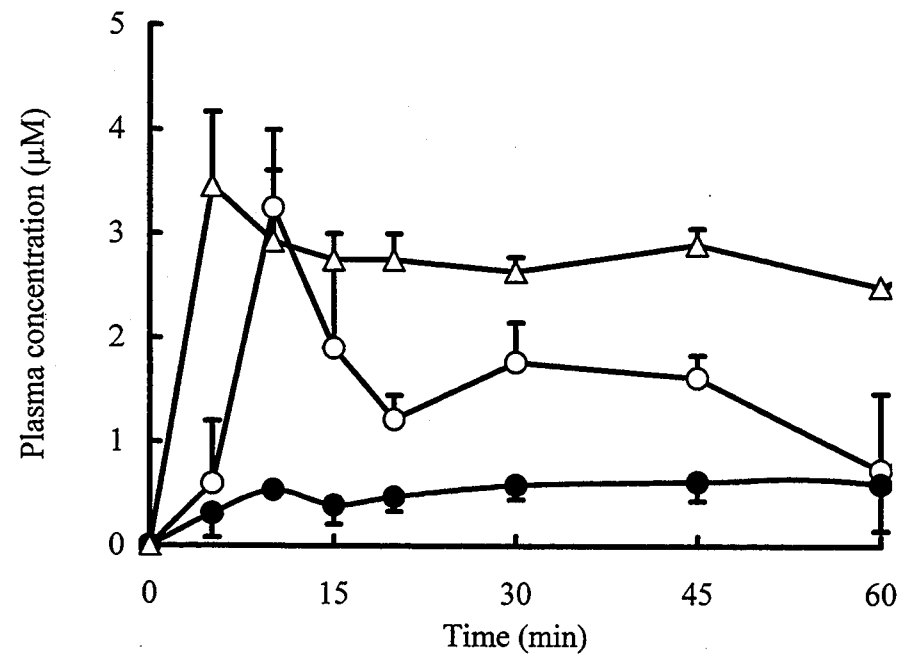


Fig.22 Plasma concentration of erythromycin after intrajejunal administration at a dose of 50 μ mol in differently treated rats
 ○ : untreated. ● : DEX-pretreated.
 △ : with MDZ (10 μ mol) in untreated.
 Each point represents the mean \pm S.E. (n=3).

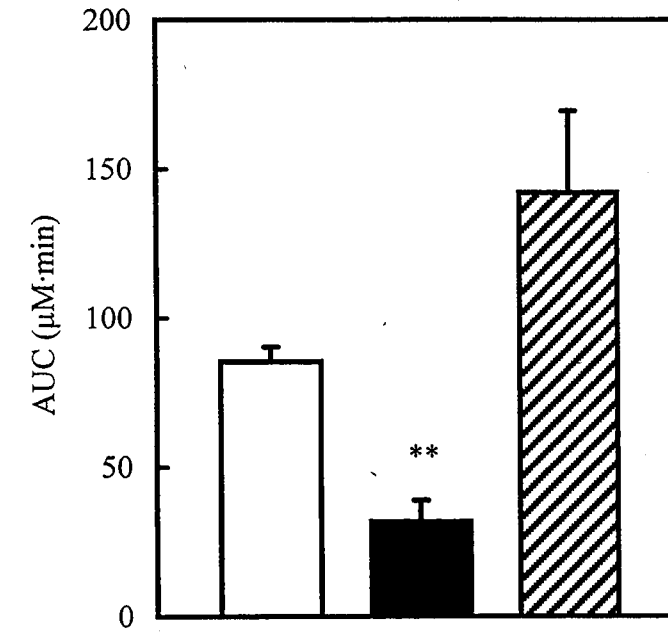


Fig.23 AUC value of erythromycin after intrajejunal administration at a dose of 50 μ mol in differently treated rats
 □ : untreated. ■ : DEX-pretreated.
 ▨ : with MDZ (10 μ mol) in untreated.
 Each point represents the mean \pm S.E. (n=3).
 ** Significantly different from untreated control at p<0.01.

第2節 消化管初回通過効果(In situ腸管ループ全血回収法)

第1節において、erythromycinの初回通過効果がdexamethasone前処置により増大し、またmidazolam併用により低下することが示された。そこで、酵素誘導及び阻害が消化管と肝初回通過効果にそれぞれどの程度影響しているかを調べるために、in situ腸管ループ全血回収法によって消化管のみの初回通過効果を測定した。まず、消化管代謝における投与量依存性を検討するため、erythromycin 1.0 μ mol及び2.5 μ molの投与を行った。Fig.24に示したように、高投与量(2.5 μ mol)で腸間膜静脈血漿中累積透過量がわずかに増加したものの、両者間に有意差は認められなかった。

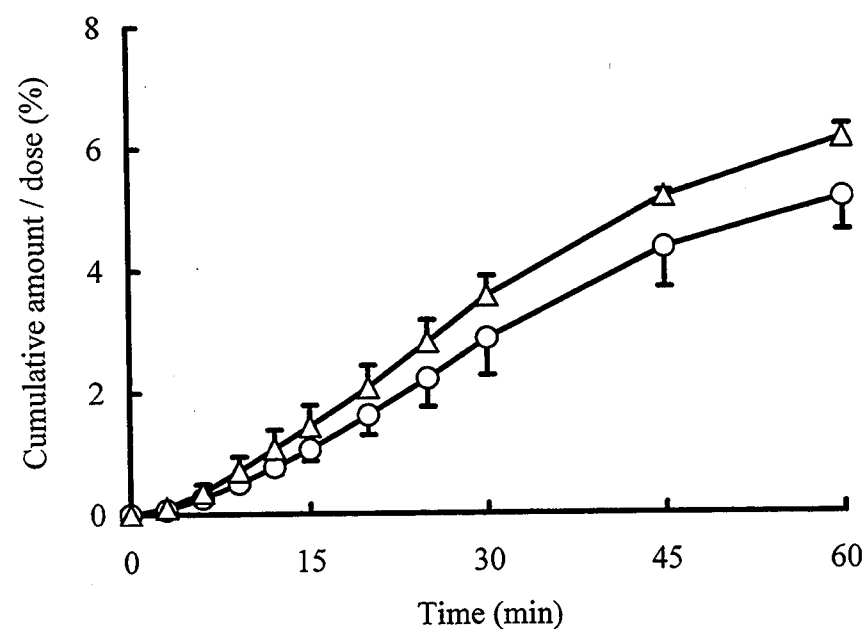


Fig.24 Cumulative amount of erythromycin in mesenteric venous blood after intrajejunal administration at two doses in rats
○: 1.0 μ mol. △: 2.5 μ mol.
Each point represents the mean \pm S.E. (n=3).

次にdexamethasone前処置及びmidazolam併用の場合について比較した(Fig.25)。投与量はerythromycinを2.5 μ mol、midazolamは10 μ molとした。Midazolam併用時のerythromycinの吸収速度及び腸間膜静脈中への累積透過量にはほとんど変化はなく、未処置ラットにおいて消化管にはerythromycin代謝活性がほとんどないことが示唆された。このようにdexamethasone前処置ラットにおいてもerythromycinの吸収速度、累積透過量に有意な低下は認められず、midazolamとは明らかに異なる結果となった。ErythromycinはP-gpの基質となることも報告されており^{63, 90)}、その代謝物が消化管側に排出されることも考えられるため、消化管ループ内及び消化管組織内残存量も考慮してtotal recoveryを比較したが、いずれの処置においても有意な差は得られなかった。これらの結果より、midazolamとerythromycinに対するdexamethasone前処置の影響の違いは、代謝に関与するCYP3A分子種の違いによるものと考えられた。

以上示したように、空腸ループ内投与(本章 第1節参照)で観察された酵素誘導時のerythromycinのbioavailabilityの低下、及びmidazolam併用によるbioavailabilityの増大は、消化管での影響によるものではなく肝における代謝の変動が関与するものと推察される。

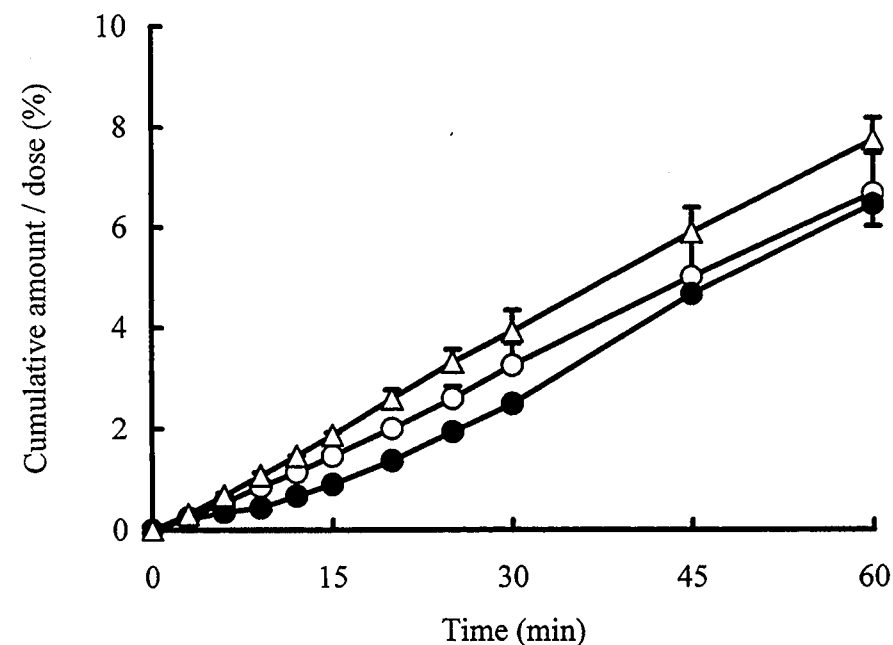


Fig.25 Cumulative amount of erythromycin in merenteric venous blood after intrajejunal administration at a dose of 2.5 μ mol in differently treated rats
○: untreated. ●: DEX-pretreated.
△: with MDZ (10 μ mol) in untreated.
Each point represents the mean \pm S.E. (n=3).

第3節 In vitro肝代謝

消化管でerythromycinの初回通過効果がほとんど認められなかったことから、空腸ループ内投与時のbioavailabilityの変動は肝において酵素誘導や代謝阻害が生じたためと考えられる。そこで、肝ミクロソームによるin vitro代謝実験によりこれらの影響について検討した。Erythromycinの代謝活性は、脱メチルで生じたホルムアルデヒドを定量することにより比較した^{30, 91)}。Erythromycinの初濃度は大過剰の1mMとし、生成するホルムアルデヒド量が直線性を示す初速度をVmaxとした。Dexamethasone前処置により、erythromycinの代謝速度は著しく増大し(Fig.26)、空腸ループ内投与時におけるerythromycinのbioavailability低下は肝初回通過効果の増大によることが明らかとなった。また、Fig.27に示したように、肝ミクロソーム中でのerythromycinの代謝はmidazolamの共存によって濃度依存的に阻害された。これらの結果より、Fig.22、Fig.23に示したerythromycinのbioavailability変動は、ほぼ肝初回通過効果の変動によって説明されることが明らかとなった。

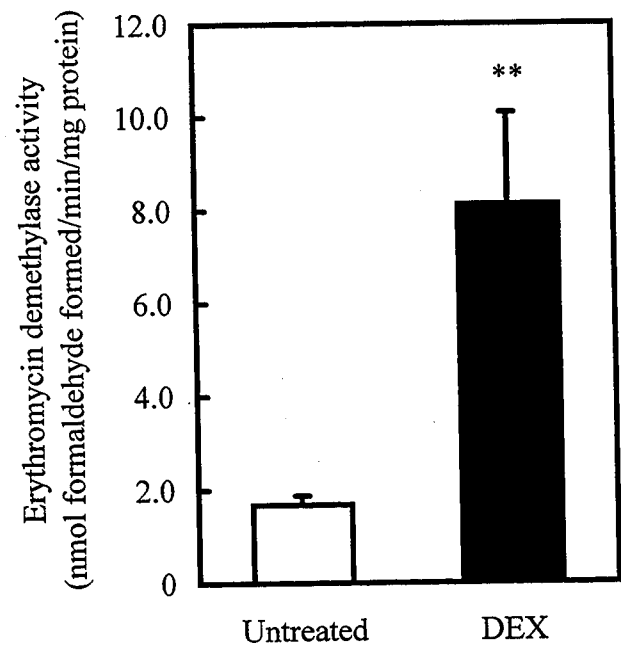


Fig.26 Metabolic activity of erythromycin in hepatic microsomes
Each value represents the mean \pm S.E. (n=3).
** Significantly different from untreated control at $p < 0.01$.

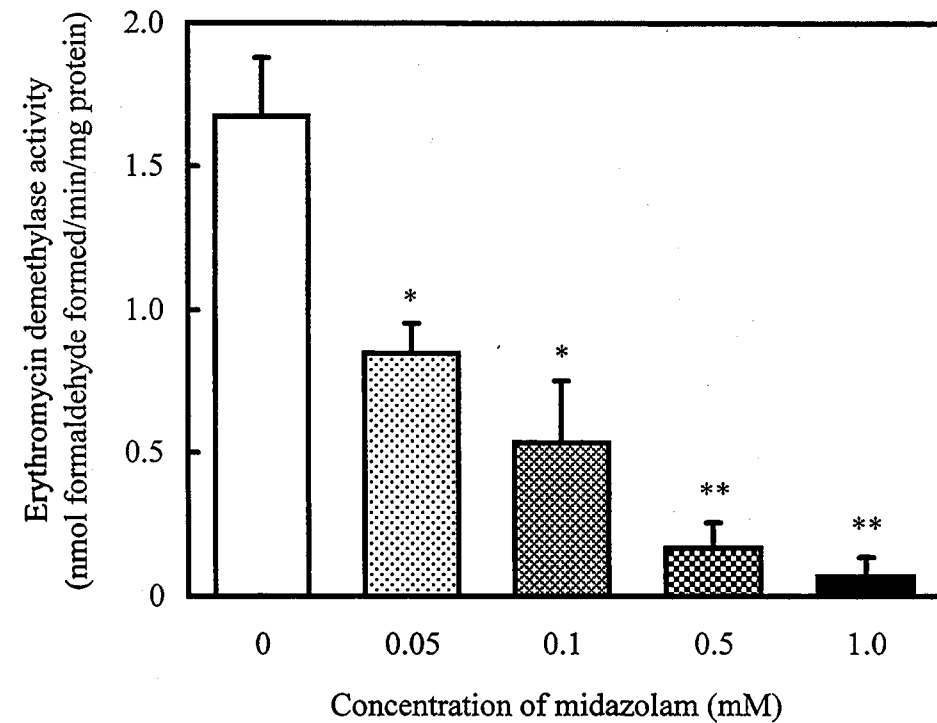


Fig.27 Metabolic activity of erythromycin in hepatic microsomes in the presence of various concentrations of midazolam.
Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-4).
* Significantly different from untreated control at $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$.

Erythromycinの初回通過効果について検討を行った結果、以下の知見が得られた。

- 1) 空腸ループ内投与において、dexamethasone前処置によりerythromycinのbioavailabilityは低下し、一方midazolamの併用により増加した。
- 2) In situ腸管ループ全血回収法においてerythromycinの腸間膜静脈血漿中への出現速度、及び累積透過量に投与量依存性は認められず、またその透過量も低く投与量の約6.7%程度であった。
- 3) In situ腸管ループ全血回収法において、dexamethasone前処置やmidazolamの併用を行っても、erythromycinの消化管透過に有意な変化は認められず、erythromycinの消化管初回通過効果はほとんど無視し得ることが示された。
- 4) In vitro肝ミクロソームを用い、dexamethasone前処置またはmidazolam併用の影響について検討した結果、dexamethasone前処置によりerythromycin N-demethylation活性は有意に増大し、一方midazolamの併用により濃度依存的に阻害された。これらのことから、dexamethasone前処置により肝のCYP3Aが誘導され、またmidazolam併用により代謝が阻害されることが示された。

ヒトにおいて主に代謝に関わるCYP3A分子種はCYP3A4であるが、他にもCYP3A5、CYP3A7などの分子種が存在する。一般に、これらの分子種はCYP3A4よりも発現量が少なく、代謝活性も低いとされている^{31, 84, 86}。しかし、CYP3A7は胎児においては重要な働きを担っている他、CYP3A5についても基質によってはCYP3A4と比較し活性が同等もしくは高い場合もある^{5, 47, 79, 92}。さらに、CYP3A5は主に腎で発現している他、肝や消化管でも見出されているが^{85, 88, 93}、肝でCYP3A5が発現している頻度は20~30%程度であると報告されている^{14, 79, 84, 87, 94}。これらのことから、CYP3A基質の代謝活性の個体差は、CYP3A5発現の個体差に起因するのではないかという説もある。あるCYP3A基質をプローブとして用いて、他のCYP3A基質の代謝活性を予測する試みが必ずしも成功しないのは、CYP3A分子種の基質特異性の差も一因と考えられる。

本章では、midazolamとerythromycinのラットにおける体内動態、及び阻害剤や誘導剤の影響について比較検討した。なお、消化管初回通過効果はin situ腸管ループ全血回収法より算出し、肝初回通過効果は空腸ループ内投与後のbioavailabilityと消化管初回通過効果より算出した。計算には前章までのデータを用い、実験の部に示した方法により算出した。

第1節 消化管初回通過効果の比較

Midazolamとerythromycinは、両者ともCYP3Aサブファミリーの基質であるが、厳密には個々の分子種に対する特異性が異なる。CYP3A4はCYP3Aの基質となる大部分の薬物を代謝することができるが、CYP3A5はmidazolamを代謝するもののerythromycinの代謝にはほとんど関与しないことが報告されている^{47, 84, 86}。ラットでも数種のCYP3A分子種が知られており、ヒトの場合と同様に分子種の基質特異性が異なるものと考えられる。

本節では、midazolamとerythromycinについて、前章までの結果から算出した消化管初回通過効果を比較した。Fig.28に示したように、erythromycinの消化管初回通過効果は、未処置ラットのみならず、dexamethasone前処置による酵素誘導時でも検出されなかった。一方、midazolamは肝と比較すると代謝率は低いものの消化管初回通過効果が観察され、dexamethasone前処置により有意に増大した。これらの結果はラットにおいて、小腸のCYP3A発現量は肝よりかなり低く、小腸のCYP3Aはdexamethasoneにより誘導されるという報告と一致する^{41, 74}。また、この初回通過効果はketoconazole併用により減少した。このようにmidazolamとerythromycinの消化管初回通過効果は両者間で大きく異なることが認められ、代謝に関わるCYP3A分子種が両者間で異なる可能性が示唆された。

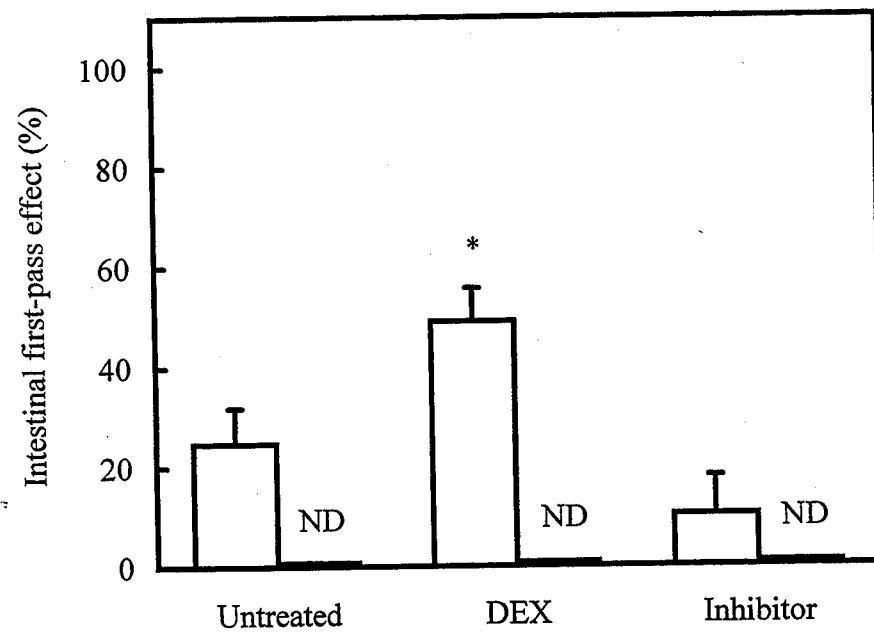


Fig.28 Comparison of intestinal first-pass effect of midazolam with that of erythromycin after intrajejeunal administration in differently treated rats
 □ : Midazolam. ■ : Erythromycin.
 Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-6).
 * Significantly different from untreated control at $p < 0.05$.
 ND : Not detected.

第2節 肝初回通過効果の比較

肝では消化管とは異なり、未処置ラットにおいてmidazolamとerythromycinの両者で初回通過効果が観察された(Fig.29)。また、両者の初回通過効果はdexamethasone前処置により有意に増大し、一方各阻害剤併用により有意に低下した。すべての処置ラットにおいてmidazolamの肝初回通過効果はerythromycinに比べはるかに高く、阻害剤併用の効果はerythromycinで顕著に認められた。なお、両者間の阻害効果の差は、阻害剤として用いた薬物(ketoconazoleあるいはmidazolam)の投与量の差にも依存していると考えられる。

Midazolamの消化管透過率が投与量の約90%と良好なのに対して、erythromycinでは約6.7%であった。Midazolamの投与量は10 μ molであるのに対しerythromycinは50 μ molと高いものであったが、消化管における代謝の差を考慮に入れても、肝に到達する薬物濃度はmidazolamの方が高く、erythromycinの代謝に飽和が生じているとは考えにくい。また、Fig.30に示したように、肝ミクロソームを用いた代謝実験で求めたVmaxは、未処置ラットにおいてmidazolamの方が高く、酵素誘導時にはさらにその差が増大した。即ち、酵素誘導による代謝活性増加率の差や消化管初回通過効果の結果と併せて考えると、両基質の代謝に関わるCYP3A分子種の基質特異性の差が、酵素誘導剤や阻害剤の影響が大きく異なる原因と考えられる。Table 10及びTable 11に消化管及び肝初回通過効果をまとめて示した。

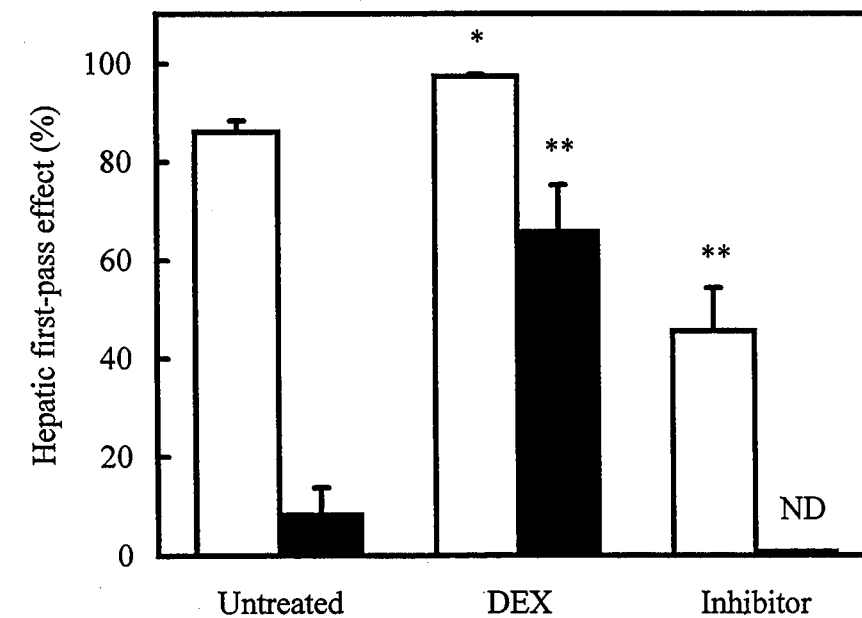


Fig.29 Comparison of hepatic first-pass effect between midazolam and erythromycin after intrajejeunal administration in differently treated rats
 □ : Midazolam. ■ : Erythromycin.
 Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-6).
 * Significantly different from untreated control at $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$.
 ND : Not detected.

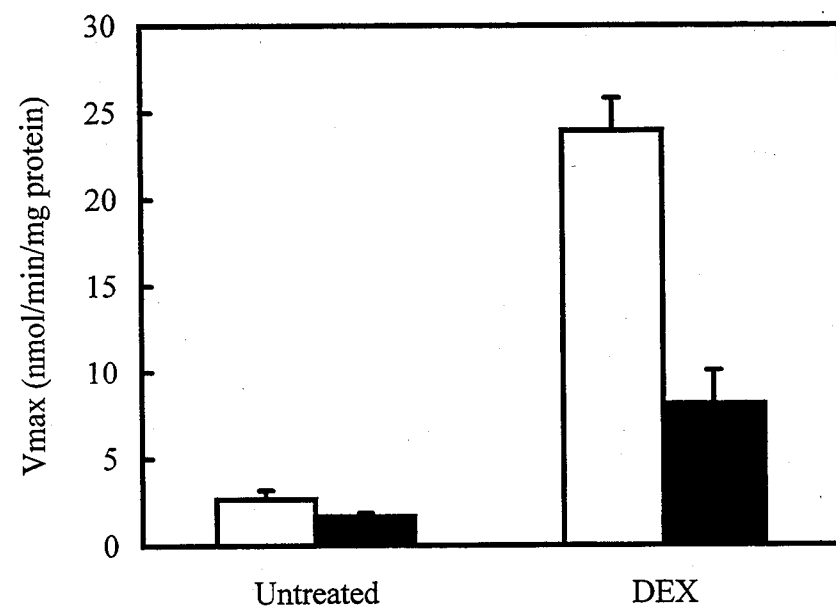


Fig.30 Comparison of Vmax values for midazolam and erythromycin in the hepatic microsomes
 □ : Midazolam. ■ : Erythromycin.
 Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-7).

Table 10 First-pass effect of midazolam after intrajejunal administration in differently treated rats

Treatment	Intestinal first-pass effect (%)		Hepatic first-pass effect (%)
	0.05 μ mol	0.5 μ mol	10 μ mol
Untreated	24.6 \pm 7.2	16.0 \pm 2.0	86.0 \pm 2.3
DEX-pretreated	49.0 \pm 6.6*	23.1 \pm 3.1§	97.3 \pm 0.4*
+ KCZ in untreated	10.3 \pm 7.7	-	45.5 \pm 8.8**
+ KCZ in DEX-pretreated	15.0 \pm 8.1††	-	91.8 \pm 2.9

Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-6).

* Significantly different from untreated control at *p<0.05 or **p<0.01.

†† Significantly different from DEX-pretreated at p<0.01.

§ Significantly different from low dose (0.05 μ mol) at p<0.05.

Table 11 First-pass effect of erythromycin after intrajejunal administration in differently treated rats

Treatment	Intestinal first-pass effect (%)	Hepatic first-pass effect (%)
Untreated	\cong 0	8.4 \pm 5.3
DEX-pretreated	\cong 0	66.0 \pm 9.3**
+ MDZ in untreated	\cong 0	\cong 0

Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-5).

** Significantly different from untreated control p<0.01.

第3節 小括

CYP3Aの基質であるmidazolamとerythromycinの初回通過効果について、消化管と肝を分離して評価し比較した結果、以下の知見が得られた。

- 1) 消化管初回通過効果は、未処置ラット、dexamethasone前処置ラットのいずれにおいても、midazolamのみで観察され、erythromycinでは検出されなかった。
- 2) Midazolamとerythromycinの肝初回通過効果は、共にdexamethasone前処置ラットにおいて増大し、阻害剤併用で低下するという傾向を示した。しかしながら、変動の程度は両薬物間で著しく異なった。

以上、ヒトにおいて報告されているerythromycinとmidazolamのCYP3A分子種選択性の差が、ラットにおいても観察された。

第5章 In vitro代謝実験によるMidazolamのin vivo肝抽出率の予測

既に述べたように、ヒトにおいてCYP3A活性の個体差は20倍以上もあり、薬物相互作用によりその個体差はさらに100倍以上になる可能性がある。臨床で用いられている多くの薬物(現在CYPで代謝されることが知られている治療薬の約50%)がCYP3A基質であり、これら基質同士の併用投与の可能性は極めて高い⁹⁵⁾。またCYP3Aはグレープフルーツジュースや赤ワインのように日常に摂取する物質によっても阻害されることが知られており、起こりうる薬物相互作用の程度をあらかじめ予測するシステムの構築が切望されている¹⁶⁻²³⁾。Erythromycin breath testのような手法も既に提唱されているが、その信頼性への疑問と放射性物質に暴露される危険性から、他の方法の模索が必要と考えられる。

CYP3A活性評価のプロブとして、生体内物質であるcortisolやその他種々のCYP3A基質が提唱されており、midazolamもプロブとして広く用いられている。一方、前章で示したようにCYP3A分子種の基質特異性の差や吸収特性、輸送系の関与、さらには投与経路を同一に設定する必要があるなど、ある基質のCYP3A代謝の予測にはその基質自身を用いるしかないと断言する研究者もいる。

ヒトにおける薬物代謝活性や薬物相互作用を予測する手法として、動物実験からヒトを予測するアニマルスケールアップや、in vitro実験からin vivo代謝を予測する方法が数々試みられてきた⁹⁶⁻⁹⁹⁾。代謝に関するアニマルスケールアップは酵素分子種の種差の問題があり、この方法には限界があると考えられる。それに対し、in vitro実験からin vivo代謝を予測する方法は、直接その動物種の肝組織や小腸組織を用いて予測することができ、種差の壁を回避できる利点がある。現在までも幾つかの薬物についての報告があるが、midazolamに関する予測はまだなされていない。また、酵素活性が種々変動する動物モデルを用いた予測に関する検討も報告されていない。

本章ではラット肝ミクロソームを用いたin vitro代謝実験より、酵素誘導剤や阻害剤を併用し酵素活性を変動させた際のmidazolamのin vivo肝代謝の予測性について検討した。

第1節 In vitro肝固有クリアランスの算出

代謝酵素と基質の反応は、Michaelis-Menten式で表される。組織固有クリアランス(CL_{int})の算出法について、Chart 6に示した。

$$v = \frac{V_{max} \cdot C_f}{K_m + C_f}$$

C_f: Free drug concentration

Under the condition of C_f << K_m

$$CL_{int} = \frac{v}{C_f} = \frac{V_{max}}{K_m + C_f} \approx \frac{V_{max}}{K_m}$$

Chart 6 Estimation of in vivo intrinsic clearance by in vitro metabolism study

本節ではmidazolamの肝代謝パラメーターを算出するため、肝ミクロソームを用いin vitro代謝実験を行った(Fig.31)。なお補酵素NADPHを添加し10分まで経時的にサンプリングした結果、midazolamの消失速度は次第に低下したため、代謝量が直線性を示す30秒後までを初速度とした。Eadie-Hofstee plot($v = V_{max} - K_m \cdot v / C_f$, Fig.32及びFig.33)解析によりmidazolam代謝のK_m、V_{max}を算出した(Table 12)。なお、ここではketoconazoleは高濃度の50μMで検討した。

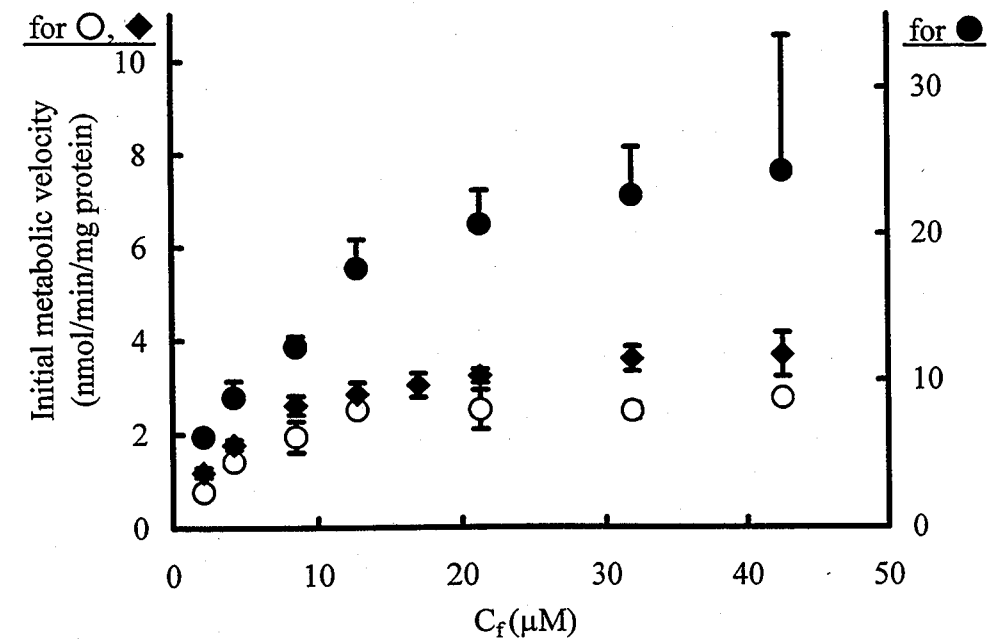


Fig.31 Metabolic rate of midazolam in the liver microsomes prepared from differently treated rats

○ : untreated. ● : DEX-pretreated.
◆ : CLO-pretreated.
Each point represents the mean ± S.E. (n=4-7).

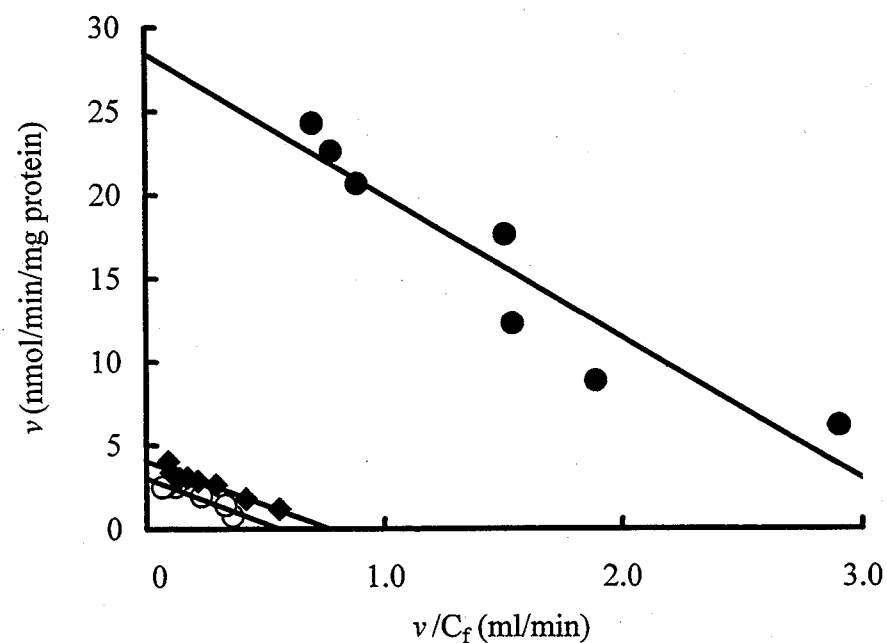


Fig.32 Eadie-Hofstee plot of midazolam in the liver microsomes prepared from differently treated rats

○ : untreated. ● : DEX-pretreated.

◆ : CLO-pretreated.

Each point represents the mean (n=4-7).

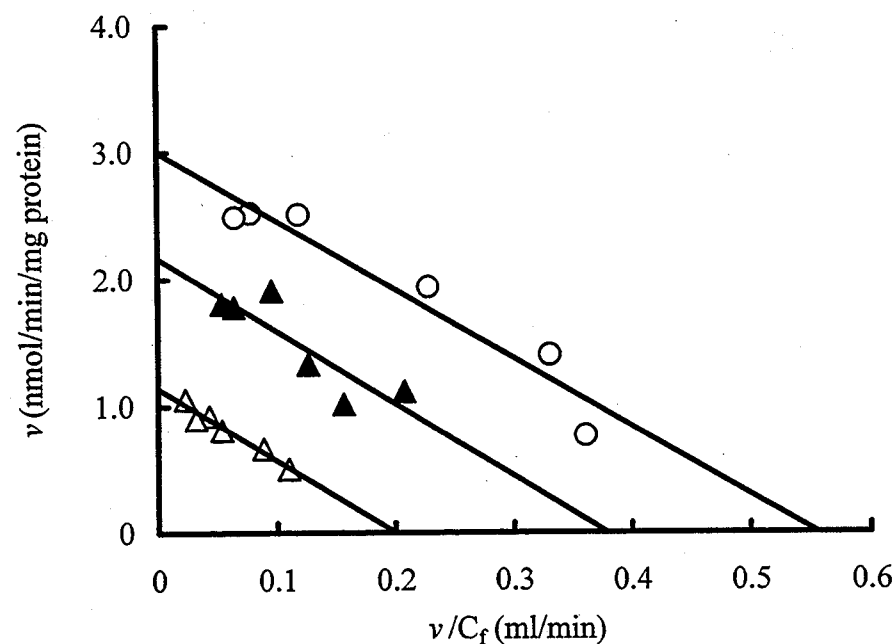


Fig.33 Eadie-Hofstee plot of midazolam in the liver microsomes prepared from differently treated rats

○ : untreated.

△ : with KCZ in untreated.

▲ : with KCZ in DEX-pretreated.

The concentration of ketoconazole was 50μM.

Each point represents the mean (n=4-5).

Table 12 Kinetic parameters of midazolam in the liver microsomes prepared from differently treated rats

Treatment	Vmax (nmol/min/mg microsomal protein)	Km (μM)	CL _{int} (Vmax/Km) (ml/min/mg microsomal protein)
Untreated	2.67 ± 0.52	5.00 ± 1.38	0.584 ± 0.065
DEX-pretreated	23.95 ± 1.87**	9.97 ± 1.22*	2.539 ± 0.213**
CLO-pretreated	3.73 ± 0.35	5.33 ± 1.30	0.781 ± 0.131
+ KCZ in untreated	1.13 ± 0.11*	5.62 ± 1.31	0.223 ± 0.025**
+ KCZ in DEX-pretreated	2.52 ± 0.42††	6.98 ± 1.67	0.418 ± 0.070††

The concentration of ketoconazole was 50μM.

Each value represents the mean ± S.E. (n=4-7).

* Significantly different from untreated control at *p<0.05 or **p<0.01.

†† Significantly different from DEX-pretreated at p<0.01.

In vivo定速静注の結果と同様に、dexamethasone前処置によりVmax及びCL_{int} (Vmax/Km)は著しく増大し、一方ketoconazole共存で有意に低下した。また、midazolamのbioavailabilityがわずかに低下したclotrimazole前処置(第2章 第2節参照)では未処置ラットに比べVmax、Vmax/Km値はわずかに増加したものの有意差は認められなかった。Eadie-Hofstee plotの結果より、ketoconazole共存下においてKm値の変動は小さく、ketoconazoleによるCYP3A阻害は非競合阻害(non-competitive inhibition)であることが示された。なお、CYP3A4(ヒト)においてketoconazoleによるmidazolamの代謝阻害は非競合阻害であることが報告されており、本実験の結果はこれと一致する結果となった⁵⁸⁾。

第2節 In vitro肝固有クリアランスからin vivo肝抽出率の予測(代謝活性亢進時)

未処置ラット、dexamethasone前処置ラット、及びclotrimazole前処置ラットにおける肝湿重量あたりのミクロソーム蛋白量、肝湿重量を測定した(Table 13)。今回得られた肝ミクロソーム含量は他の報告値に比べ若干低い値となっているが^{60, 100}、生化学データブック[I](東京化学同人、日本生化学会編)に記載されている値と一致している¹⁰¹。また、dexamethasone前処置によりラットの肝湿重量が有意に増大したが、イヌでも同様の報告がなされている¹⁰²。In vitro肝ミクロソーム代謝実験より得られたCL_{int}(ml/min/mg microsomal protein)より、Table 13に示した実測ミクロソーム蛋白量及び肝湿重量を用いて、体重(kg)あたりの肝固有クリアランス(CL_{int, in vitro}(ml/min/kg))をChart 7に示した式より算出した。なお、in vitro実験条件下(ミクロソーム蛋白濃度は2.5mg/ml、dexamethasone前処置ラットでは0.2mg/ml)でのミクロソーム蛋白へのmidazolamの結合率は、4℃、NADPH無添加の条件で平衡透析法にて算出した。Midazolamのミクロソーム蛋白への結合率は蛋白濃度2.5mg/mlの条件で 57.5 ± 1.1% (n=39)、0.2mg/mlの条件で 19.8 ± 6.2% (n=11)であった。

Table 13 Microsomal protein content and liver wet weight in differently treated rats

Treatment	Microsomal protein (mg microsomal protein/g liver)	Liver wet weight (g liver/kg body weight)
Untreated	20.7 ± 0.5	46.5 ± 2.1
DEX-pretreated	24.6 ± 0.7*	61.9 ± 2.3**
CLO-pretreated	23.5 ± 1.8	50.9 ± 1.9

Each value represents the mean ± S.E. (n=3-7).

* Significantly different from untreated control at *p<0.05 or **p<0.01.

$$CL_{int, in vitro} = V_{max}/K_m \cdot \text{microsomal protein content} \cdot \text{liver wet weight}$$

Chart 7 Estimation of hepatic intrinsic clearance (ml/min/kg) from in vitro study
V_{max}/K_m (ml/min/mg microsomal protein)

3種の生理学的モデル、即ちwell-stirred model、parallel tube model、及びdispersion modelを用いてin vivo肝抽出率からCL_{int, in vivo}を算出した(Chart 8)。その際、肝血流量 Q_H = 0.95ml/g liver⁶⁰、midazolamの血漿中蛋白非結合率 f_p = 0.083 ± 0.013 (n=10)、血中濃度-血漿中濃度比 R_B = 0.733(第1章 第1節参照)、及び血中蛋白非結合率 f_B = f_p / R_B = 0.113を用いた。

Well-stirred modelは、肝組織に流入した薬物が、流れ方向に瞬時に分布平衡が生じると仮定するもので、定常状態における肝内濃度は門脈側から肝静脈側まで一定となる。それに対し、parallel-

tube modelでは流れ方向の混合拡散は全く生じないと仮定するもので、定常状態では門脈側から肝静脈側にかけて濃度勾配が生じ、濃度は徐々に低下する。さらに、血流方向へある程度の薬物の混合拡散を考える方法がdispersion modelであり、これはwell-stirred modelとparallel-tube modelの中間に位置する考え方で、より実体に近いモデルとして最近主流になりつつある。このモデルにおけるdispersion number(D_N)は文献値0.17を用いた⁶⁰。

In vivo定常状態の動物実験から算出した肝固有クリアランス(CL_{int, in vivo})とin vitro代謝実験より予測した肝固有クリアランス(CL_{int, in vitro})を各モデルについて比較し、Table 14に示した。In vitro実験から予測した肝固有クリアランスはwell-stirred modelではin vivo実験からの計算値の約7~22%、parallel-tube modelでは約65~164%、dispersion modelでは約44~97%であった。このように、parallel-tube modelとdispersion modelを用いた場合の今回の予測結果は良好と考えられる。

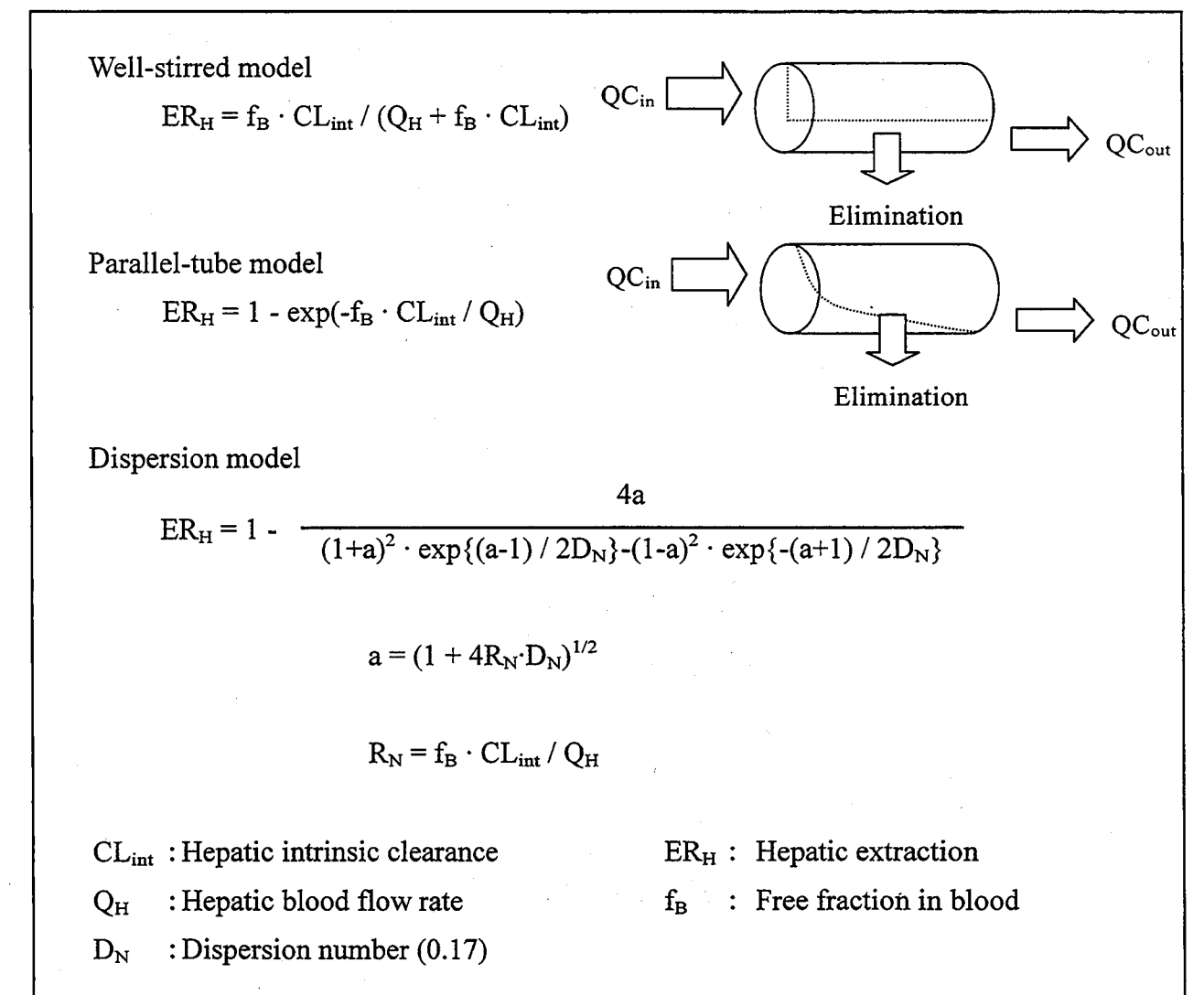


Chart 8 Estimation of hepatic extraction ratio by three different physiological models

Table 14 In vivo hepatic intrinsic clearance of midazolam estimated by different physiological models and in vitro hepatic intrinsic clearance of midazolam estimated by in vitro metabolism study

Treatment	CL _{int, in vivo} (L/min/kg)			CL _{int, in vitro} (L/min/kg)
	Well-stirred model	Parallel-tube model	Dispersion model	
Untreated	2.60 ± 0.46**	0.78 ± 0.06	1.02 ± 0.09**	0.56 ± 0.06
DEX-pretreated	58.77 ± 12.22**	2.35 ± 0.20**	3.97 ± 0.43	3.87 ± 0.32
CLO-pretreated	12.09 ± 1.85**	1.43 ± 0.06*	2.14 ± 0.12**	0.93 ± 0.16

Each value represents the mean ± S.E. (n=3-7).

* Significantly different from in vitro study at *p<0.05 or **p<0.01.

更に、in vitro代謝実験より算出した肝固有クリアランス(CL_{int, in vitro})より、各生理学的モデルを用いてin vivo肝抽出率(ER_H)を予測した。なお、midazolam定速静注時の定常状態における血漿中非結合形濃度は、in vitro肝ミクロソーム実験より得られたKm値よりも十分に低い値となっている(線形領域)。Fig.34、Fig.35、Fig.36にそれぞれ示したように、実測の肝抽出率(observed ER_H)に対して、in vitroより予測した肝抽出率は、well-stirred modelで約68~89%、parallel-tube modelで約87~101%、dispersion modelが約81~100%であった。このように、parallel-tube model及びdispersion modelでmidazolam肝抽出率の実測値と予測値は非常に良く一致し、高クリアランス薬物midazolamの肝代謝をin vitro実験より、かなりの精度で予測できることが示された。

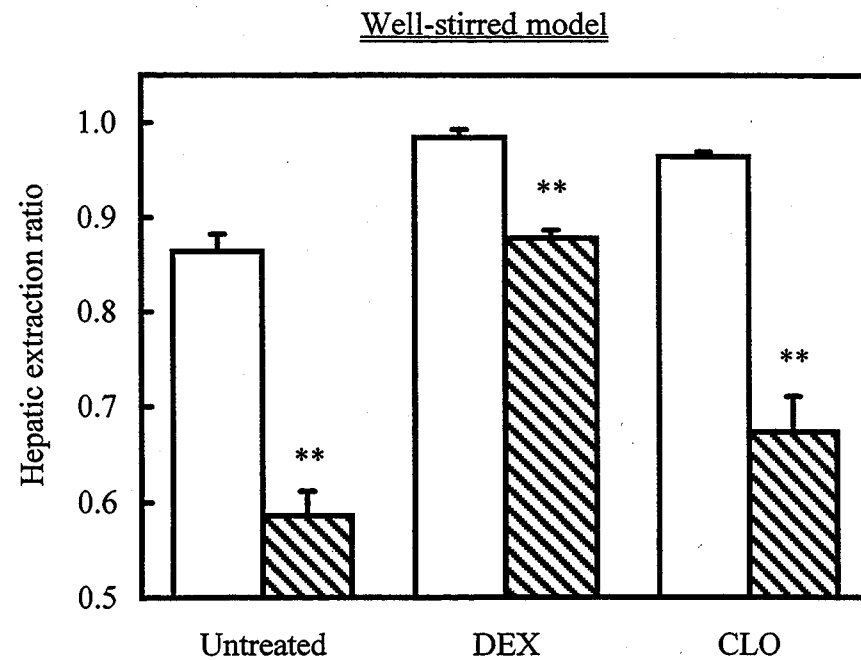


Fig.34 Prediction of hepatic extraction ratio of midazolam from in vitro study according to well-stirred model

□: observed. ▨: predicted.

Each value represents the mean ± S.E. (n=3-7).

** Significantly different from observed in vivo at p<0.01.

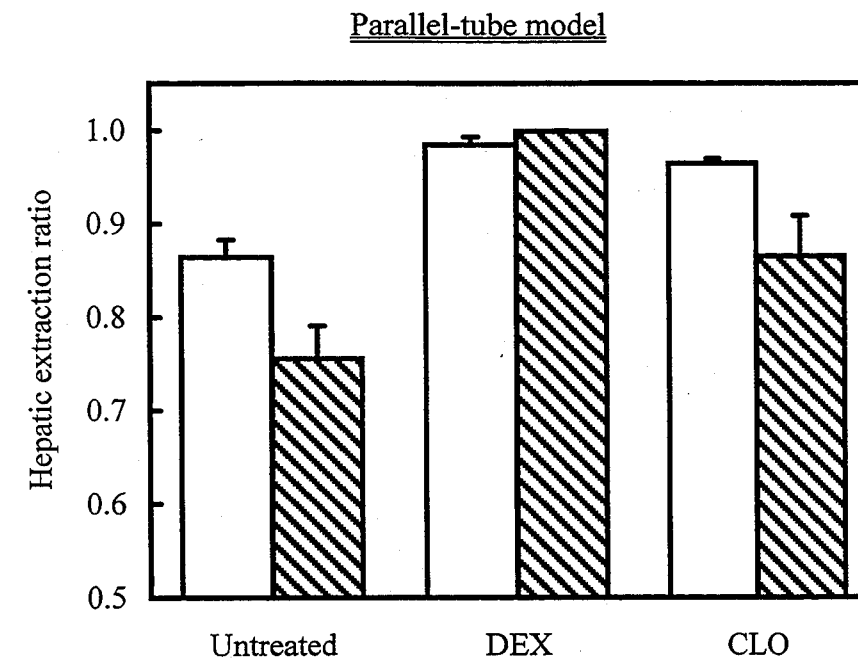


Fig.35 Prediction of hepatic extraction ratio of midazolam from in vitro study according to parallel-tube model

□: observed. ▨: predicted.

Each value represents the mean ± S.E. (n=3-7).

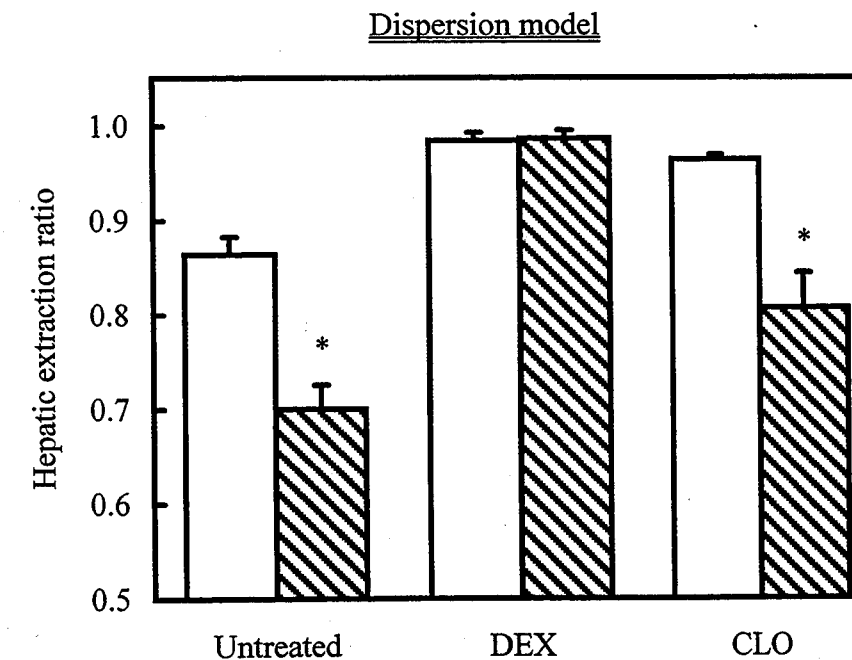


Fig.36 Prediction of hepatic extraction ratio of midazolam from in vitro study according to dispersion model

□: observed. ▨: predicted.

Each value represents the mean ± S.E. (n=3-7).

* Significantly different from observed in vivo at p<0.05.

第3節 In vitro肝固有クリアランスからin vivo肝抽出率の予測(代謝活性低下時)

阻害剤併用時のin vivoにおける固有クリアランスの変動を予測する為には、Chart 9に示したように、阻害剤のmidazolam代謝に対する阻害定数(Ki)を測定すると共に、阻害剤自身の肝内非結合形濃度([I])を正確に予測する必要がある。Ketoconazoleはヘム鉄に配位結合することによりCYP3Aを阻害することが知られている。そこでまず、ketoconazoleが自殺基質的な挙動を示すか否かについて検討するため、ketoconazoleをラットに投与し、24時間後に阻害効果が残存するか否かについて検討した。しかしながら24時間後ではmidazolamのbioavailabilityに変動は認められず、今回の条件、即ち単回投与ではketoconazoleのCYP3Aへの不可逆的な結合による阻害は関与せず、共存時のみ阻害作用を示すものと考えられる。

次にmidazolamと同様の方法で、ketoconazole自身の定速静注時の肝抽出率(ER_H)及び消化管抽出率(ER_G)を測定した。Ketoconazoleの投与速度は、midazolamの阻害剤として用いた際の20nmol/minと、高投与量として50nmol/minで行った。得られた各パラメーター値をTable 15に示した。高投与量時と低投与量時で、ketoconazoleの全身クリアランス及び肝抽出率は一定の値を示し、血漿中濃度の影響は認められなかった。また、血液側からの消化管抽出率もmidazolam同様、ほぼ無視し得ることが認められた。

Table 15 Pharmacokinetic parameters of ketoconazole at steady-state plasma concentrations

Infusion rate:	Untreated		DEX-pretreated
	(50nmol/min)	(20nmol/min)	(20nmol/min)
C _{ss} (μM)	8.05 ± 0.35	3.09 ± 0.21	3.83 ± 0.11
CL _{total} (ml/min/kg)	19.1 ± 0.2	21.7 ± 1.4	22.8 ± 4.7
Portal vein concn (μM)	8.32 ± 0.73	2.74 ± 0.31	4.10 ± 1.70
Hepatic vein concn (μM)	2.96 ± 1.27	1.29 ± 0.17	1.61 ± 0.67
ER _H	0.629 ± 0.163	0.580 ± 0.081	0.608 ± 0.125
ER _G	0.066 ± 0.040	0.177 ± 0.102	0.124 ± 0.112

CL_{total} = Infusion rate / steady-state plasma concentration (C_{ss}).

Each value represents the mean ± S.E. (n=3-6).

次にketoconazoleのKi値について検討した。In vivo定速静注時に用いた投与量における、阻害剤ketoconazoleの定常状態血漿中濃度が得られたので、in vitro代謝実験における共存ketoconazole濃度を5μMとし、各パラメーター値を算出した。

Eadie-Hofstee plotをFig.37に示した。In vitro実験条件下でのミクロソーム蛋白へのketoconazoleの結合率は、midazolamと同様に4℃、NADPH無添加で平衡透析法にて測定した結果、2.5mg microsomal protein/ml中において96.3 ± 1.2%であった。また、50μMのmidazolamを共存させても、ketoconazoleの結合率には変化が認められなかった。これらの結果より、in vitro実験時のketoconazole非結合形濃度は0.183μMとして計算に用いた。Fig.37より、ketoconazoleによるmidazolamの代謝阻害は非競合阻害(non-competitive inhibition)であり、ketoconazole共存時のmidazolamの肝固有クリアランスはChart 9の式により求められることが示された。

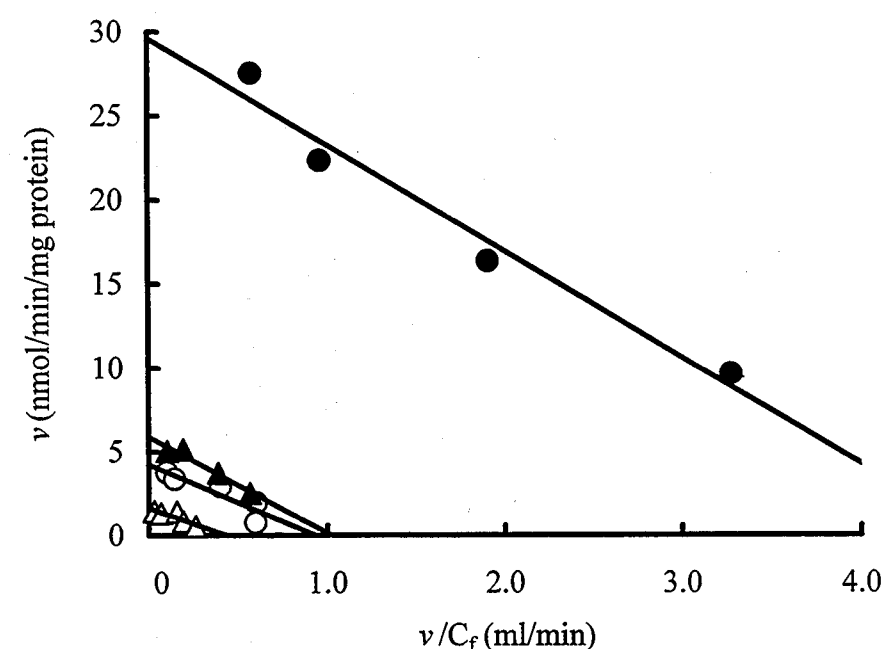


Fig.37 Eadie-Hofstee plot of midazolam in the liver microsomes prepared from differently treated rats

○ : untreated. ● : DEX-pretreated.
△ : with KCZ in untreated ▲ : with KCZ in DEX-pretreated.

The concentration of ketoconazole was 5μM.

Each point represents the mean (n=3-4).

Non-Competitive Inhibition

$$v = \frac{V_{max} \cdot C_f}{(K_m + C_f) \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Under the linear condition

$$CL_{int} = v / C_f = V_{max}/K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)^{-1}$$

C_f : Free concentration of a substrate

K_i : Inhibition constant

$[I]$: Free concentration of an inhibitor

Chart 9 Estimation of intrinsic clearance under non-competitive inhibition by in vitro metabolism study

Table 16 Free concentration of ketoconazole in portal vein and hepatic vein plasma under a steady-state condition

Treatment	C_f in portal vein (μM)	C_f in hepatic vein (μM)
Untreated	0.101	0.048
DEX-pretreated	0.152	0.059

The infusion rate of ketoconazole was 20nmol/min (see Table 15).
Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-4).

Table 17 Inhibition constant of ketoconazole and hepatic intrinsic clearance of midazolam estimated using in vivo portal venous or hepatic venous free concentration of ketoconazole

Treatment	K_i (μM)	CL_{int} (ml/min/mg microsomal protein)	
		C_f in portal vein	C_f in hepatic vein
Untreated	0.126 \pm 0.038	0.451 \pm 0.023	0.590 \pm 0.030
DEX-pretreated	0.063 \pm 0.020	0.896 \pm 0.051	1.570 \pm 0.089

Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-4).

肝細胞内への取り込み過程に特殊輸送系の関与が存在する場合や、肝細胞内での薬物の局在(濃縮)などを除外すれば、一般に肝内非結合形薬物濃度は血中非結合形薬物濃度(C_f)と等しいものと考えられる。現在、ketoconazoleの肝への特殊取り込み機構は報告されておらず、ラット遊離肝細胞を用いた実験による報告では、ketoconazoleの肝細胞への濃縮度はほぼ1に近いとされており、特殊輸送系の存在はほとんど無視して良いと思われる¹⁰³⁾。そこで、阻害剤の肝内非結合形濃度を、門脈内非結合形濃度(入り口)で近似できるのか、あるいは肝静脈血中非結合形濃度(出口)で近似できるのかについて検討を行った。In vivoで行った実験条件、即ち、midazolamと併用投与した際のketoconazoleの投与速度20nmol/min(血漿中濃度;約3nmol/ml)の定常状態において、門脈血中と肝静脈血中との間で非結合形ketoconazole濃度の見積もりが異なる(Table 16)。そこでketoconazole併用時のmidazolamの肝固有クリアランスを、門脈及び肝静脈それぞれの血漿中非結合形ketoconazole濃度を用いて算出した(Table 17)。なお、in vivoでの非結合形ketoconazole濃度の算出には血漿中蛋白非結合率の報告値、3.7%を用いた¹⁰⁴⁾。さらに、これらの肝固有クリアランスより本章 第2節 Chart 7に示した式に従い、体重kgあたりの肝固有クリアランスに換算した。Fig.38にはその一例として、in vivo肝抽出率からparallel-tube modelを用いて算出した肝固有クリアランスとの比較を示した。Fig.38に示したように、門脈と肝静脈を比較した場合、門脈内の非結合形ketoconazole濃度を用いて予測した方が、よりin vivo肝固有クリアランスと一致することが認められた。そこで、3種の生理学的モデルを用い門脈内の非結合形ketoconazole濃度とin vitro代謝実験よりin vivo肝抽出率を予測した結果、parallel-tube model及びdispersion modelで良好に一致した(Fig.39)。

このようにin vivoにおける門脈内阻害剤非結合形濃度が得られれば、酵素誘導時と同様に阻害剤併用時におけるin vivo肝代謝をin vitro実験より精度良く予測できることが明らかとなった。これらの知見は、臨床上起こりうる薬物相互作用を、代謝活性亢進時(酵素誘導)、低下時(阻害)の両者について、前臨床の段階でヒト肝ミクソームを用いたin vitro実験よりかなりの精度で予測できることを示すものである。阻害剤に対する肝への特殊輸送系がある場合においては、ヒト遊離肝細胞などを用い、さらに肝への濃縮率等を考慮することが重要と考えられる。

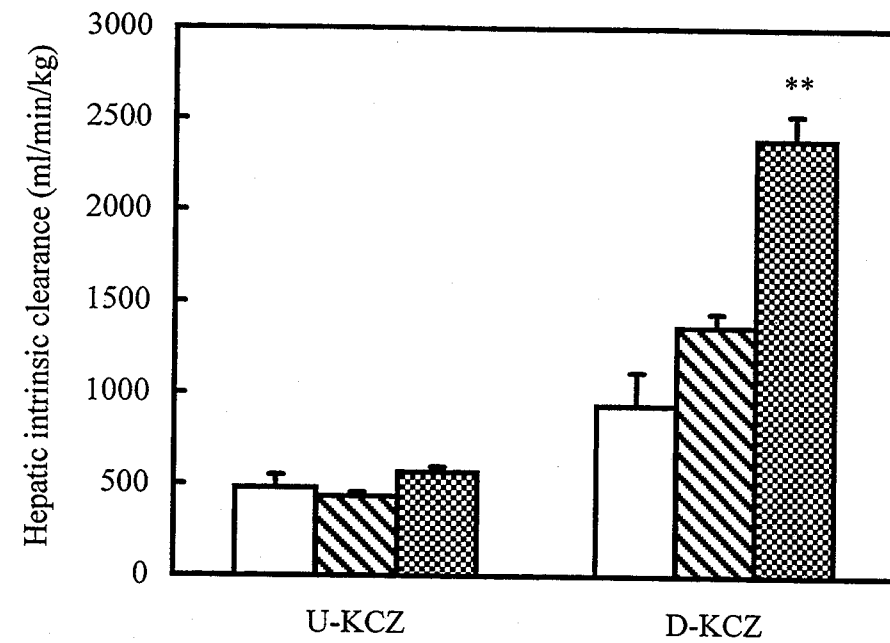


Fig.38 Comparison of hepatic intrinsic clearance of midazolam in the presence of ketoconazole between in vivo (estimated by parallel-tube model) and in vitro studies

□: in vivo. ▨: in vitro (using portal venous free concentration).
 ▩: in vitro (using hepatic venous free concentration).

Each value represents the mean ± S.E. (n=3-4).

** Significantly different from observed in vivo at p<0.01.

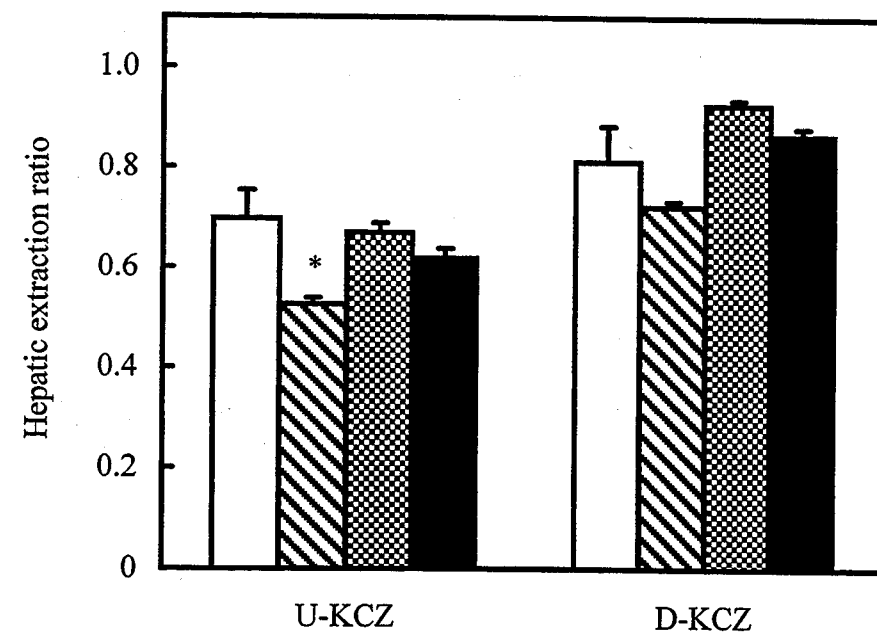


Fig.39 Prediction of hepatic extraction ratio of midazolam under differently modulated enzyme activity from in vitro study by three different physiological models

□: observed. ▨: in vitro by well-stirred model.
 ▩: in vitro by parallel-tube model. ■: in vitro by dispersion model.

Each value represents the mean ± S.E. (n=3-4).

* Significantly different from observed in vivo at p<0.05.

第4節 小括

In vitro代謝実験からin vivo肝抽出率の予測性について検討した結果、以下の知見が得られた。

- 1) In vitro肝ミクロソームを用いたmidazolam代謝実験において、dexamethasone前処置やclotrimazole前処置によりin vitro肝固有クリアランス(V_{max}/K_m)は増大し、一方ketoconazole共存により有意に低下した。
- 2) 代謝活性亢進時(酵素誘導剤前処置)において、in vitro肝ミクロソームを用いた代謝実験より、生理学的モデルであるparallel-tube model及びdispersion modelを用いて、midazolamのin vivo肝抽出率を精度良く予測できることが示された。
- 3) 代謝活性低下時(阻害剤共存)において、in vivo定速静注時の門脈内ketoconazole非結合形濃度を肝内非結合形薬物濃度とみなし、さらにparallel-tube model及びdispersion modelを用いることによって、in vitro実験からmidazolamのin vivo肝抽出率を精度良く再現できることが示された。

総括

近年、ヒトにおけるin vivo代謝を、in vitro代謝実験より予測する必要性が認識されてきているが、その中でも薬物相互作用の予測システムの構築は薬物による副作用(adverse drug reaction; ADR)を予防し、適切な処方設計を行うためにも必須となっている。ある報告では米国における致命的なADRが推定106000人(1年間)であり、これを死亡原因として扱えば心臓疾患、癌、脳卒中に次いで1994年の死亡原因の第4位となる数字である。即ち、医薬品情報の提供と適正な投与設計がなされていれば、これだけ多くの人が死から免れ得る可能性があると考えられる。

種々の薬物相互作用のうち、その機構が代謝の阻害や誘導に起因するものは少なくとも全体の1/3を占める。さらに、代謝に関わる薬物相互作用の大部分(約95%)にCYPが関与しており、また約1/2の医薬品の代謝にはCYP3Aサブファミリーが関与すると考えられている⁹⁵⁾。CYP3Aの関与が多いのは、CYP3Aはヒト消化管及び肝に最も多く存在するCYPサブファミリーであり、さらに臨床で用いられる薬物の多くがCYP3A基質であることによると考えられる。CYPに関わる薬物相互作用は主に酵素誘導と阻害があるが、酵素誘導(血漿中濃度低下)よりも阻害(血漿中濃度上昇)の方が危険であり、頻度も全体の約2/3を占める。従って、代謝阻害による薬物相互作用の予測システムの構築は、その頻度と危険性から考えて急務であると言える。

本研究ではmidazolam及びerythromycinをCYP3A代謝のプロープとして用い、ラットにおけるこれら薬物の体内動態に及ぼす酵素誘導剤・阻害剤の影響を比較検討した。さらにmidazolamについて、肝ミクロソームを用いたin vitro代謝実験よりin vivo肝代謝・抽出率を予測するシステムの構築を試みた。実験にあたり、肝のCYP3A活性を酵素誘導剤前処置やCYP3A阻害剤を併用することにより変化させ、代謝活性亢進時及び代謝活性低下時の両条件下で検討した。得られた知見を以下にまとめる。

1) Midazolam及びerythromycinのbioavailabilityは酵素誘導剤による前処置やCYP3A阻害剤の併用により、顕著に変動した。

2) 正常時及び酵素活性変動時の、midazolam及びerythromycinの消化管及び肝初回通過効果を分離評価した結果、CYP3A基質であるmidazolamとerythromycinでは、ラット消化管において両者の代謝挙動が異なり、また、肝においても酵素誘導剤の効果に差が観察された。これらのことから、midazolamとerythromycinを代謝するCYP3A分子種が異なる可能性が示唆された。

3) 正常時及び酵素誘導時のmidazolamの肝初回通過効果を、肝ミクロソームを用いたin vitro代謝実

験から、精度良く予測することが可能となった。

4) 阻害剤ketoconazole併用時のmidazolamの肝抽出率の変動は、ketoconazoleの門脈内非結合形濃度を肝内非結合形薬物濃度として用いることにより、肝ミクロソームを用いたin vitro代謝実験から精度良く予測できた。

肝臓において薬物Bによる薬物Aに対する代謝阻害がある場合、競合阻害及び非競合阻害のいずれにおいても経口投与した薬物AのAUCの変動は $AUC \cdot (1 + [I] / K_i)$ で表される¹⁰³⁾。即ち、薬物Aに対する薬物Bの代謝阻害定数(K_i)と代謝部位(肝内)における阻害剤Bの非結合形薬物濃度 $[I]$ の情報が得られれば、薬物Aの血中濃度の上昇度を算出することができる。ここで K_i 値は肝ミクロソームを用いたin vitro代謝実験より算出することができる。一方、in vivoにおける肝内の阻害剤濃度の推定はかなりの困難を伴う。通常、肝内非結合形薬物濃度は組織と平衡状態にある血液中非結合形濃度に等しいものと言われているが、その平衡状態の考え方は生理学的モデル間で大きく異なる。例えば、well-stirred modelでは良く攪拌されていることから組織静脈血中非結合形濃度に等しいと考えられる。一方、parallel-tube modelでは入り口(門脈内濃度、 C_{in})と出口(組織静脈中濃度、 C_{out})の対数平均濃度 $(C_{in} - C_{out}) / \ln(C_{in} / C_{out})$ に非結合形分率を乗じたものが、肝内非結合形薬物濃度に等しいと考えるものである。阻害剤自身の肝内取り込み機構に特殊輸送系などが関与する場合は、さらにそれによる濃縮性も考慮する必要がある。このように非常に複雑なプロセスであり、通常臨床においてはいずれの濃度(C_{in} , C_{out})の見積もりも困難と言える。

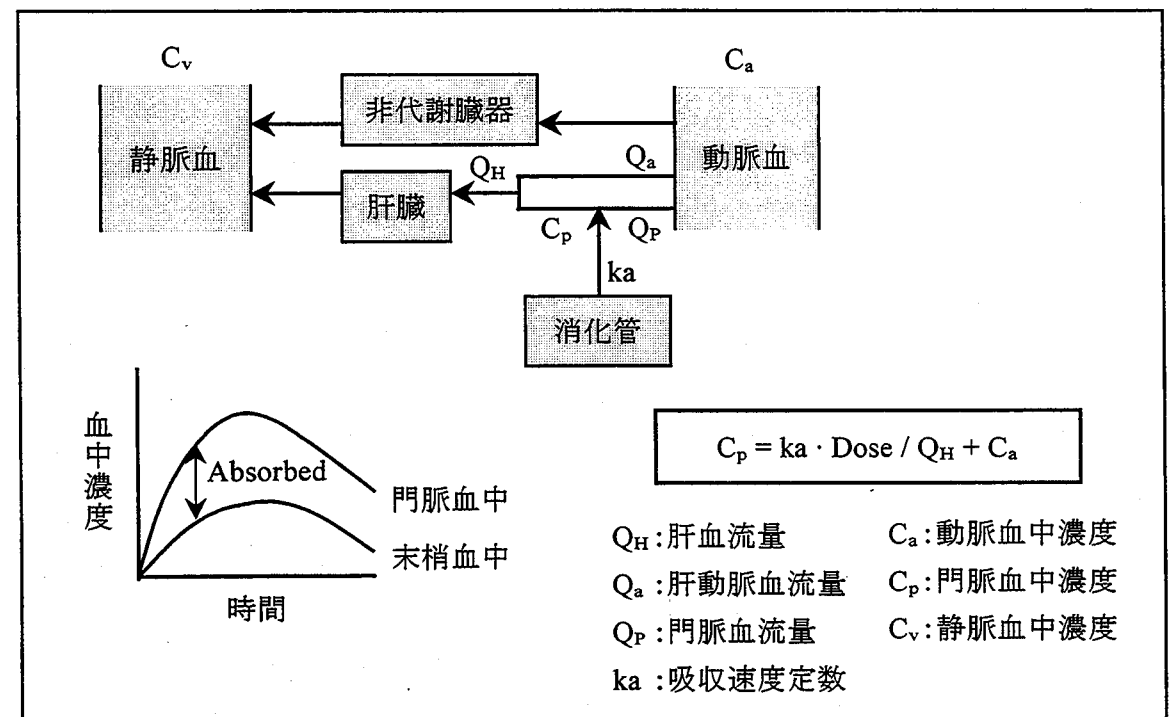


Fig.40 Estimation of portal venous blood concentration after oral administration

上記に示した図(Fig.40)は、現在提唱されている門脈内最大薬物濃度の見積もり法である^{103, 105)}。薬物は消化管より $ka \cdot Dose$ という速度で門脈内に移行し肝血流(速度)(Q_H)で希釈される。いったん肝を通過した薬物は肝動脈血からさらに肝に流入するというモデルである。ここで、門脈血中濃度を吸収過程から算出するためにはFig 40に示したように吸収速度定数(ka)が必要であるが、この値の算出のためには初期吸収段階において少なくとも数点の採血をする必要があり、臨床においてこの式を用いて門脈内最高血中濃度を算出することは非常に困難と考えられる。それでは、どのようにすればよいただろうか？

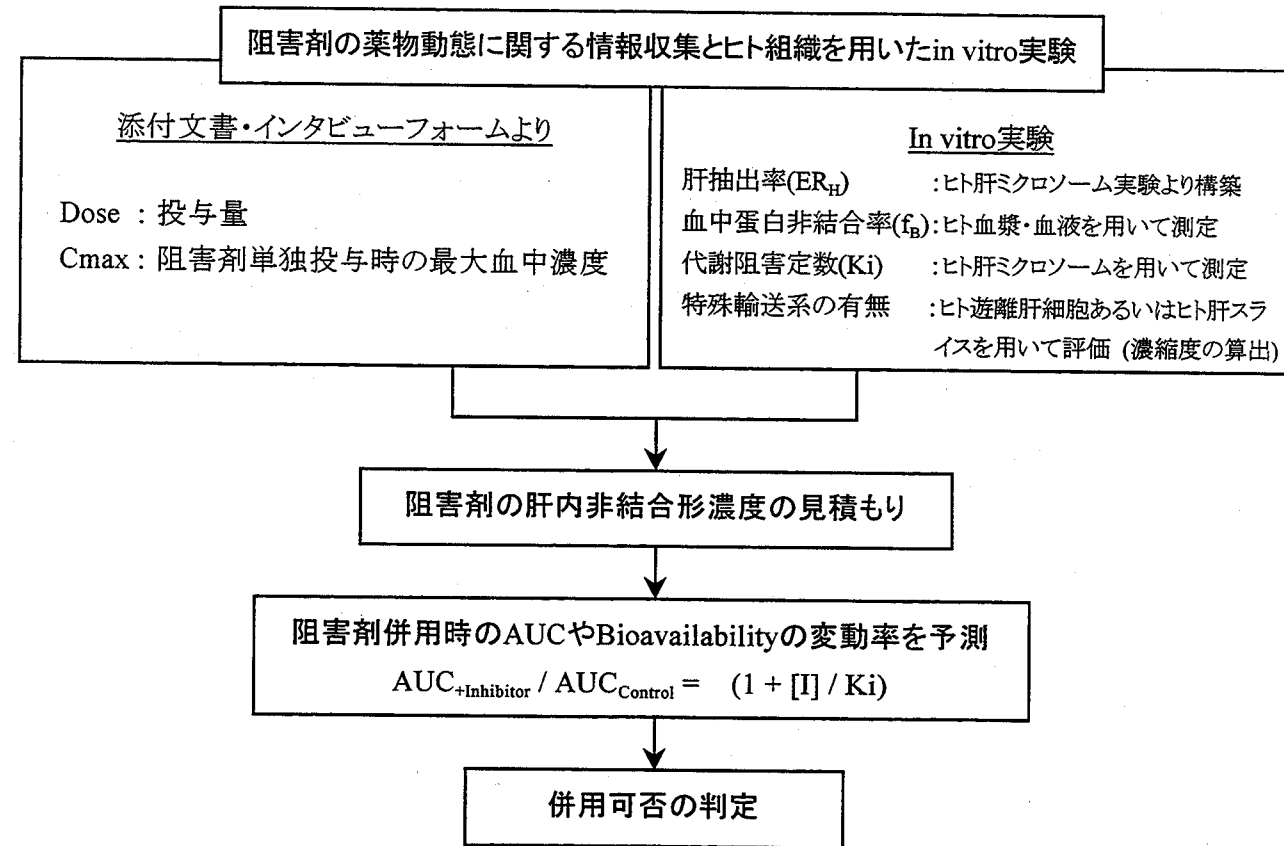


Chart 10 Prediction of the changes in AUC and bioavailability based on in vitro study

本研究の結果、得られた知見を基に薬物相互作用の予測と投与設計までの流れをフローチャートにまとめた(Chart 10)。臨床で得られる情報として阻害剤単独投与時の末梢静脈血漿中濃度があるが、Chart 10はこの値から門脈内非結合形薬物濃度を算出し、続いて肝内非結合形薬物濃度を見積もる方法である。即ち、阻害剤の吸収速度定数(ka)が与えられなければ吸収方向からの門脈血中濃度を求めることは不可能であるが、阻害剤の肝抽出率が得られれば末梢静脈血中濃度から逆に門脈血中濃度を算出することが可能であると考えられる。阻害剤の静脈投与時の全身クリアランスの情報がある場合は、肝抽出率(ER_H) = CL_H / Q_H (主に肝代謝のみで消失する場合 $CL_H \doteq CL_{total}$ 、腎クリアランスが関与する場合 $CL_H \doteq CL_{total} - CL_r$ など、全身クリアランスより肝クリアランスを算出)で求

めることができる。しかしながら、それら情報が無い場合には、本実験で示したように肝ミクロソームを用いたin vitro代謝実験からin vivo肝抽出率を精度良く予測できることが明らかとなり、この方法で阻害剤の肝抽出率を算出できると考えられる。さらに特殊輸送系の有無などを考慮すれば、阻害剤併用時のAUCやbioavailabilityの変動を予測できると考えられる。

以上のように、肝代謝における薬物相互作用を予測することはほぼ可能であることが明らかとなった。しかしながら、本文中でも述べたようにCYP3A基質の中には消化管においても肝と同程度の代謝を受ける薬物も多く、薬物相互作用を考える上で消化管を無視することはできない。またCYP3A基質とP-gp基質がオーバーラップしている例も多く報告されており、消化管における薬物相互作用の予測はさらに複雑なものになると考えられる。消化管における代謝過程の薬物相互作用については、吸収速度との関係より細胞内薬物濃度の算出が非常に困難であり、現在までに予測はなされていない。しかし、ここで薬物相互作用の予測という観点から考えると、臨床で用いるためには相互作用の過小評価は非常に危険であり、むしろ過大評価の方が望ましい。つまり、最悪の相互作用を想定し、阻害剤併用時の消化管における $F_a \times F_g = 1$ (吸収率100%、代謝0%)と仮定し、肝における相互作用の予測を行えば、少なくとも過小評価すること無く予測が可能と考えられる。

以上述べたように、本研究で得られた知見は薬物療法における安全性や信頼性の確保、及び薬物相互作用の予測や回避において有益な情報を与えるものと期待される。

謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して終始ご懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました広島大学医学部総合薬学科 医療薬剤学講座 高野 幹久教授に慎んで感謝いたします。

また、終始御指導を賜りました広島大学医学部総合薬学科 医療薬剤学講座 村上 照夫助教授に深謝いたします。

さらに、有益な御助言を賜りました広島大学医学部総合薬学科 医療薬剤学講座 永井 純也助手、湯元 良子技官に心より御礼申し上げます。

また、お世話になりました金田 達也修士、加藤 晶子学士、牧野 美早緒学士をはじめ、医療薬剤学教室の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、midazolamを御提供下さいました日本ロシュ株式会社、及びketoconazoleを御提供下さいましたヤンセン協和株式会社に深謝いたします。

実験の部

I 使用薬物

Midazolam及びketoconazoleは以下より供与された。

Material (Abbreviation)	Suppliers
Midazolam(MDZ)	日本ロシュ株式会社
Ketoconazole (KCZ)	ヤンセン協和株式会社

その他、本実験に用いた各試薬は以下より購入した。

Material (Abbreviation)	Suppliers
Erythromycin (EM)	メルク・ジャパン株式会社
Dexamethasone (DEX)	和光純薬工業株式会社
Clotrimazole (CLO)	Sigma Chemical Company
Phenobarbital (PB)	東京化成工業株式会社
Pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN)	Sigma Chemical Company
Polyoxyethylenesorbitan-monolaurate (Tween 20)	Sigma Chemical Company
ホルムアルデヒド テスト ワコー	和光純薬工業株式会社

他の試薬は市販特級品を用いた。

II 使用動物

Sprague-Dawley (SD)系雄性ラット、体重240-280g(8週齢~9週齢)を使用した。

なお、第2章 第1節では6週齢~7週齢(200-240g)も用いた。また、in situ腸管ループ全血回収法の輸血用の血液はSprague-Dawley (SD)系雄性ラット、体重500g以上より採取した(第2章 第4節及び第3章 第2節)。

III 使用器具

In situ腸管ループ全血回収法の輸血用カテーテルには、グロブリンV用輸液セット(富士臓器製薬株式会社)を用いた(第2章 第4節及び第3章 第2節)。

またmidazolamやketoconazoleの蛋白結合率は、透析膜seamless cellulose tubing(Size:20/32、三光純薬株式会社)を用いて、平衡透析法で測定した。

IV 実験方法

第1章の実験

1) 薬液の調製

In vivo急速単回静注

Midazolamを5~20mMの濃度で、25% ethanol、25% propylene glycol含有水溶液に溶解した。Ketoconazoleを併用する際は2mMの濃度でmidazolam溶液に溶解した。

In vivo定速静注

Midazolamを2.5mMの濃度で20% ethanol、20% propylene glycol含有水溶液に溶解した。Ketoconazoleを併用する際は1mMの濃度でmidazolam溶液に溶解した。

2) ラット前処置

Dexamethasone 50mgを2% tween20含有水溶液0.5mlに懸濁し、1日1回2日間腹腔内投与した。各対象群には2% tween20含有水溶液のみを0.5ml腹腔内投与した。これらの処置を行い、24時間後に実験に用いた。

3) In vivo静脈内投与

ラットにペントバルビタール(30mg/kg)を腹腔内投与して麻酔し、股静脈及び股動脈にヘパリン(200単位/ml)を充填したポリエチレンチューブ(PE-50)を用いてカニューレを施した。実験期間中ラットの体温を維持するため、ラットを37℃のwater bed上に固定した。血液凝固防止のため、薬液投与前にヘパリン(200単位/ml)0.6mlを静注した。薬液(5~20mM)を股静脈カニューレより1ml/kgで急速単回静注し、股動脈カニューレより経時的に採血した。採取した血液は直ちに卓上遠心機で10,000rpm、5分間遠心し血漿中薬物濃度を、また全血の場合は4倍量の蒸留水を添加し溶血させ、血中薬物濃度を測定した。

また、胆管にポリエチレンチューブ(PE-10)でカニューレを施し、薬液投与後60分間胆汁を採取した。尿は実験終了後膀胱を取り出し、その全量を測定に用いた。

4) In vivo定速静注

ラットにペントバルビタール(30mg/kg)を腹腔内投与して麻酔し、股動脈にカニューレを施した。実験期間中ラットの体温を維持するため、ラットを37℃のwater bed上に固定した。血液凝固防止のため、薬液投与前にヘパリン(200単位/ml)0.6mlを静注した。Midazolam 2.5mMの薬液を0.5ml急速単回静注後、さらに0.02ml/minの速度で定速静注した。Ketoconazole併用の場合には、ketoconazole 1.0 μ mol/mlの濃度でmidazolam溶液と混合し、0.5mlを急速単回静注、さらに0.02ml/minで定速静注した。股動脈カニューレより採血すると共に、定常状態に達した後(約40分後)に、肝静脈及び門脈血を採取した。肝静脈及び門脈血の採血は、26Gの注射針をU字型にし、ヘパリン溶液を充填したポリエチレンチューブ(PE-50)を接続したものを血管に穿刺し、穿刺部分を外科用接着剤(Aron alphaA, 三共)で固定した。

5) Midazolamの血球分布測定

実験終了後(midazolam投与)のラットより血液を回収し、その血中濃度(C_B)及び血漿中濃度(C_P)をそれぞれ測定し、midazolamの血球分布(R_B)を C_B / C_P として求めた。

6) Midazolamの血漿中及び血中濃度測定

採取した血液を卓上遠心機で10,000rpm、5分間遠心分離し、血漿サンプルを得た。血漿100 μ lに飽和リン酸二ナトリウム100 μ lを添加、攪拌し、6mlの酢酸エチルを加え15分間振盪、1000g、10分遠心し、酢酸エチル層を5mlを分取し、溶媒を減圧下留去した。血中濃度は、血液に4倍量の蒸留水を添加して溶血させ、その1mlに飽和リン酸二ナトリウム1mlを加え、上記と同様に酢酸エチルで抽出し溶媒を減圧留去した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)測定直前に残渣をmethanol 100 μ lで溶解し、以下の条件で定量した。

HPLC条件

Column	TSKgel ODS-80Tm
Temperature	Ambient temperature
Mobile Phase	CH ₃ OH : H ₂ O : 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) : CH ₃ CN = 60 : 29 : 10 : 1
Flow Rate	1.0ml/min
Detector	UV-970
Wavelength	229nm

第2章の実験

1) 薬液の調製

In vivo空腸ループ内投与

Midazolamを10mMの濃度で、25% ethanol、25% propylene glycol含有水溶液に溶解した。Ketoconazoleを併用する際は2mMの濃度でmidazolam溶液に溶解した。

In situ腸管ループ全血回収法

Midazolamを0.025~1mMの濃度で、0.3~10% ethanol溶液に溶解した。Ketoconazoleを併用する際は0.5mMの濃度でmidazolam溶液に溶解した。

In vitro小腸マイクロソーム代謝実験

Midazolamを2.5~25 μ M(最終濃度1~10 μ M)の濃度で、少量のethanolで溶解後、Tris-HCl buffer(pH 7.4)でメスアップした。

2) ラット前処置

Dexamethasoneによる前処置は第1章の実験と同様に行った。Clotrimazole 30mgを2% tween20含有水溶液0.5mlに懸濁し、1日1回3日間腹腔内投与した。Phenobarbital 30mgを生理食塩水0.5mlに溶解し、1日1回3日間腹腔内投与した。Pregnenolone 16 α -carbonitrile 10mgを2% tween20含有水溶液0.5mlに懸濁し、1日1回3日間腹腔内投与した。

各対象群にはそれぞれ2% tween20含有水溶液のみ、あるいは生理食塩水のみを0.5ml腹腔内投与した。いずれも最後の処置から24時間後に実験に用いた。

3) In vivo空腸ループ内投与

一晩絶食したラットにペントバルビタール(30mg/kg)を腹腔内投与して麻酔し、股動脈カニューレを施した。実験期間中ラットの体温を維持するため、ラットを37°Cのwater bed上に固定した。血液凝固防止のため、薬液投与前にヘパリン(200単位/ml)0.6mlを静注した。空腸上部を約5mlの生理食塩水(37°C)で洗浄し、10±1cmのループを作成した。薬液(10mM) 1mlを投与後、経時的に股動脈カニューレより採血した。実験終了後直ちに腸管ループを摘出し、ループ内残存量を測定した。また、直ちに腸管ループをホモジナイズし、組織内薬物量を測定した。

4) In situ腸管ループ全血回収法^{76,77)}

一晩絶食したラットにペントバルビタール(30mg/kg)を腹腔内投与して麻酔し、股静脈にカニューレを施した。実験期間中ラットの体温を維持するため、ラットを37°Cのwater bed上に固定した。模式図に示したように、腹部を切開し空腸上部を37°Cの生理食塩水で洗浄後、10±1cmのループを作成した。ループ内を通過した血液を全量回収できる位置の腸間膜静脈にポリエチレンチューブ(PE-50)を用いてカニューレを施し、外科用接着剤(Aron alphaA, 三共)で固定した。他のラットより採取した新鮮血(3.8%クエン酸ナトリウムを10%含む)を、股静脈カニューレより0.38ml/minの速度で輸血し、失血を補った。血液凝固防止のため、輸血前にヘパリン(1000単位/ml)0.2mlを静注した。ループ内に薬液(0.05または0.5mM)1mlを投与し、連続的かつ経時的に腸間膜静脈カニューレより採血し、採取した血液の重量を測定して血流速度を算出した。薬液投与前、及び実験終了直後のヘマトクリット値を測定し、血漿中濃度、血球分布(R_B)及び血流量から薬物の回収量を算出した。実験終了後直ちにループを摘出し、ループ内残存量を測定した。また、直ちに腸管ループをホモジナイズし、組織内薬物量を測定した。

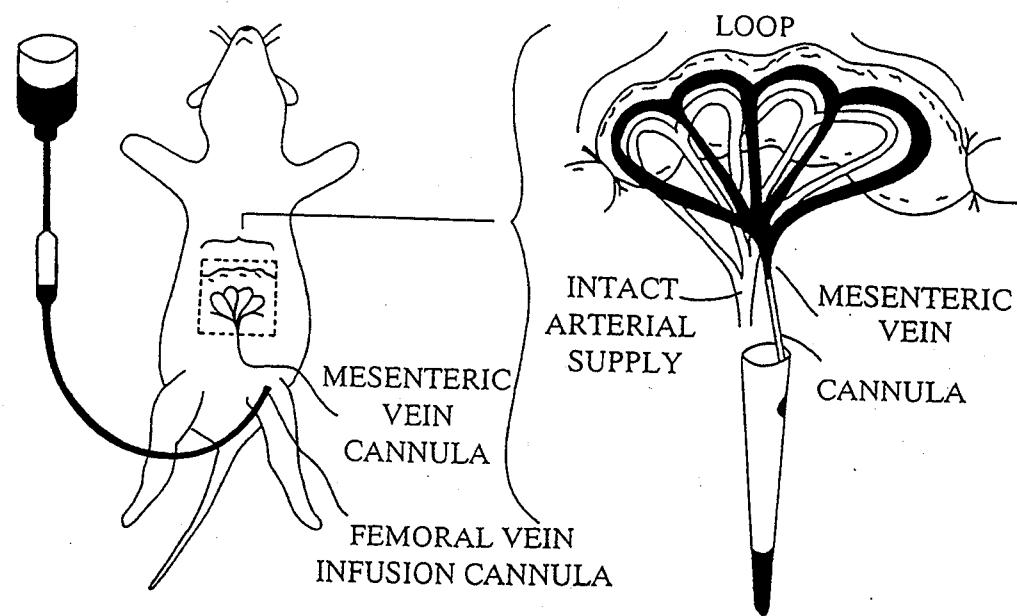


Fig.41 Diagrammatic representation of in situ intestinal loop preparation.

5) 腸管ループからのmidazolam回収率の算出

ラットを脱血致死した後、ループ内にmidazolam 0.05μmol及びketoconazole 0.5μmolを投与した(ketoconazole併用はmidazolamの代謝を防ぐため)。その後ループを摘出し、in situ腸管ループ全血回収法の場合と同様にmidazolamのループ内残存量及び組織内残存量を測定し、回収率(91±2%, n=5)を算出した。

6) In vitro小腸マイクロソーム調製法

ラットをエーテル麻酔後断頭し、直ちに空腸上部から回腸下部までを摘出した。4°Cの生理食塩水で小腸内を洗浄後反転し、カバーガラスで粘膜をかきとり、4倍量のA液(10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150mM KCl)を添加した。Glass teflon homogenizerで1,000rpm、10strokesの条件でホモジナイズした。直ちに冷却遠心機にて8,000g、15分間遠心し、その上清を18,000gで15分間、さらにその上清を100,000g、1時間遠心した。得られたpelletを1.2mlのA液で懸濁し、小腸マイクロソーム調製液とした。

7) In vitro代謝実験

小腸マイクロソーム調製液1mlに100mM MgCl₂(A液で溶解)100μlを添加し、37°Cで10分間、プレインキュベーションした。20mM NADPH(A液で溶解)100μl、及び薬液800μl(A液で溶解)を添加した時を0timeとし、経時的に300μlずつサンプリングした。

最終濃度	MgCl ₂	5mM
	NADPH	1mM
	Midazolam	1~10μM

8) Midazolamの小腸マイクロソーム懸濁液中濃度測定

代謝実験の小腸マイクロソームサンプル300μlに氷冷acetonitrile 500μlを添加して除蛋白し、上清を減圧乾固した。100μlの蒸留水で再溶解し、以後血漿サンプルと同様に飽和リン酸二ナトリウム 100μlを添加して以後の抽出操作を行った。

9) Midazolamの血漿中、ループ内残存及び消化管組織内薬物量の測定

血漿中濃度は、第1章の実験と同様の方法で測定した。ループ内残存薬物量及び腸組織内残存量の測定は、それぞれ一定量にメスアップし、その上清1mlに飽和リン酸二ナトリウム1ml添加して以後の抽出操作を行った。HPLC測定直前に残渣をmethanol 100μlで溶解し、第1章の実験と同様の条件で定量した。

第3章の実験

1) 薬液の調製

In vivo空腸ループ内投与

Erythromycinを50mMの濃度で、40% ethanol含有水溶液に溶解した。Midazolamを併用する際は10mMの濃度でerythromycin溶液に溶解した。

In situ腸管ループ全血回収法

Erythromycinを1mMあるいは2.5mMの濃度で、40% ethanol含有水溶液に溶解した。Midazolamを併用する際は10mMの濃度でerythromycin溶液に溶解した。

In vitro肝ミクロソーム代謝実験

Erythromycinを2.5mM(最終濃度1mM)の濃度で、10%量のethanolで溶解後、Tris-HCl buffer(pH 7.4)でメスアップした。Midazolamを併用する際は最終濃度が0.05~1mMの濃度となるようerythromycin溶液に溶解した。

2) ラット前処置

Dexamethasoneによる前処置は第1章の実験と同様に行った。

3) In vivo空腸ループ内投与

第2章の実験と同様の方法でerythromycin(50mM)を1ml、空腸ループ内に投与した。

4) In situ腸管ループ全血回収法

第2章の実験と同様の方法でerythromycin(1mMあるいは2.5mM)を1ml、空腸ループ内に投与した。

5) In vitro肝ミクロソーム調製法

ラットをエーテル麻酔後断頭し、直ちに肝臓を摘出し4倍量のA液(10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150mM KCl)を添加した。Glass teflon homogenizerで1,000rpm、10strokesホモジナイズした。直ちに冷却遠心機にて8,000g、15分間遠心し、その上清を18,000gで15分間、さらにその上清を100,000g、1時間遠心した。得られたpelletを適量のA液で懸濁し、5mg microsomal protein/mlとなるよう調製した。なお、上記の操作はすべて4℃で行った。

6) In vitro代謝実験

肝ミクロソーム調製液1mlに100mM MgCl₂(A液で溶解)100μlを添加し、37℃で10分間、プレインキュベーションした。20mM NADPH(A液で溶解)100μlに続いて薬液800μl(A液で溶解)を添加した時を0timeとし、経時的に100μlずつサンプリングした。

最終濃度	ミクロソーム蛋白量	2.5mg microsomal protein/ml
	MgCl ₂	5mM
	NADPH	1mM
	Erythromycin	1mM

7) 蛋白定量

Bradford法で行った。

8) Erythromycin血漿中濃度測定

採血した血液を卓上遠心機で10,000rpm、5分間で遠心分離後、血漿 100μlに0.5M K₂CO₃ 1mlを添加、攪拌し、6mlの酢酸エチルを加え15分間振盪、1000g、10分遠心し、酢酸エチル層を5mlを分取し、溶媒を減圧下留去した。HPLC測定直前に残渣をmobile phase 150μlで溶解し、以下の条件で定量した。

HPLC条件

Column	TSKgel ODS-80Tm
Temperature	Ambient temperature
Mobile Phase	CH ₃ OH : 0.1M Potassium phosphate buffer(pH 7.4): CH ₃ CN = 45 : 50 : 5
Flow Rate	1.0ml/min
Detector	JUSCO 840-EC
Voltage	1.0~1.2V (Oxidation)

9) Erythromycinの肝ミクロソーム懸濁液中での代謝活性の測定

代謝実験の肝ミクロソームサンプル100μlに氷冷アルカリ試薬(ホルムアルデヒド テスト ワコー)1mlを添加して除蛋白し、1000g、10分間で遠心分離した上清1mlに発色試薬0.5mlを添加した。攪拌し15分間放置した後、酸化試薬0.5mlを加え15秒間振盪攪拌し、1000g、10分間で遠心分離した。その上清を吸光光度計で吸光度(波長550nm)を測定した。

第4章の計算法

1) 消化管初回通過効果の算出

Midazolamの消化管初回通過効果は第2章 第4節 Fig.14~Fig.18より求めたF_Gを用い、(1 - F_G)として算出した。Erythromycinの消化管初回通過効果は第3章 第2節 Fig.24、Fig.25の結果より、ほぼ無視できると判断した。

2) 肝初回通過効果の算出

Midazolamの肝初回通過効果はbioavailability(第2章 第3節 Fig.12参照)と、in situ腸管ループ全血回収法の結果(第2章 第4節 Fig.14~Fig.18参照)より、第2章 Fig.8に示した式を用いて算出した。その際、midazolamの消化管初回通過効果は、空腸ループ内投与時の投与量である10μmolではほとんど無視できることが示されたので、F_G≒1として計算に用いた。Midazolamと同様にerythromycinでも消化管初回通過効果が無視できるため、第3章 第1節の結果を用いてmidazolamと同様の方法で算出した。

第5章の実験

1) 薬液の調製

In vitro肝ミクロソーム代謝実験

Midazolamを50~250μM(最終濃度20~100μM)の濃度で、少量のethanolで溶解後、Tris-HCl buffer(pH 7.4)でメスアップした。Ketoconazoleを併用する際は最終濃度が50μMあるいは5μMの濃度となるようmidazolam溶液に溶解した。

In vivo定速静注

Ketoconazoleを2.5mMあるいは1.0mMの濃度で、20% ethanol、20% propylene glycol含有水溶液に溶解した。

Ketoconazole前処置用

Ketoconazoleを1.0mMの濃度で、20% ethanol、20% propylene glycol含有水溶液に溶解した。

2) ラット前処置

Dexamethasoneによる前処置は第1章の実験と同様に行った。Clotrimazoleによる前処置は第2章の実験と同様に行った。Ketoconazoleによる前処置は、1.0mMの薬液を2ml/ratで背部4箇所に分けて皮下投与した。投与から24時間後に実験に用いた。

3) Midazolamの血漿中蛋白結合率の測定

平衡透析法により行った。実験終了後(midazolam投与)のラットより血液を回収し、その血漿2mlを透析膜中に封入し、外液PBS(pH7.4)、4mlに対して透析を行った。4°Cで3日間放置し、内液と外液の濃度比より、蛋白結合率を算出した。

4) 肝ミクロソーム懸濁液中Midazolamの非結合形薬物濃度測定

平衡透析法により行った。最終濃度は、肝ミクロソーム蛋白質が2.5または0.2mg microsomal protein/ml、midazolamが5, 20, 100μMとなるよう調製した。透析膜中に肝ミクロソーム懸濁液2mlを封入し、外液としてPBS(pH7.4)、4mlを用いた。4°Cで3日間放置し、内液と外液の濃度比より、蛋白結合率を算出した。

5) Ketoconazole前投与の影響(In vivo空腸ループ内投与)

Ketoconazoleを2μmol皮下投与し、24時間後にmidazolamを空腸ループ内投与した。実験方法は第2章の実験と同様に行った。Ketoconazole血漿中残存の有無を確認するために、midazolam投与前の血漿中ketoconazole濃度も測定した。

6) In vivo定速静注(Ketoconazole)

第1章の実験と同様の方法でketoconazoleを投与した。

7) 肝ミクロソーム懸濁液中Ketoconazoleの非結合形薬物濃度測定

平衡透析法により行った。最終濃度は、肝ミクロソームが2.5mg microsomal protein/ml、ketoconazoleが5, 50μMとなるよう調製した。透析膜中に肝ミクロソーム懸濁液2mlを封入し、外液としてPBS(pH7.4)、4mlを用いた。4°Cで3日間放置し、内液と外液の濃度比より、蛋白結合率を算出した。また、midazolamを50μMの共存下についても同様に行った。

8) In vitro肝ミクロソーム調製法

第3章の肝ミクロソーム調製と同様の方法で行った。得られたミクロソームは、5mg及び0.4mg proteinとなるよう懸濁した。

9) In vitro代謝実験

第3章の肝ミクロソーム調製と同様の方法で行った。

最終濃度	ミクロソーム蛋白量	2.5, 0.2mg microsomal protein/ml
	MgCl ₂	5mM
	NADPH	1mM
	Midazolam	5~100μM

10) 蛋白定量

Bradford法で行った。

11) Midazolamの肝ミクロソーム懸濁液中濃度測定

代謝実験の肝ミクロソームサンプル100μlに氷冷acetonitrile 150μlを添加して除蛋白し、それを減圧乾固した。100μlの蒸留水で再溶解し、以後血漿と同様に飽和リン酸二ナトリウム100μlを添加して以後の操作を行った。

12) Ketoconazole血漿中濃度測定

Midazolamと同様の抽出法を用いた。

HPLC条件

Column	TSKgel ODS-80Tm
Temperature	Ambient temperature
Mobile Phase	CH ₃ OH : H ₂ O : 0.1M phosphate buffer(pH 7.4) : CH ₃ CN = 70 : 19 : 10 : 1
Flow Rate	1.0ml/min
Detector	UV-970
Wavelength	229nm

参考文献

- 1) W. Kalow: Pharmacogenetics: its biologic roots and the medical challenge. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **54**, 235-241 (1993)
- 2) R. T. Coutts, P. Su, G. B. Baker: Involvement of CYP2D6, CYP3A4, and other cytochrome P-450 isozymes in N-dealkylation reactions. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.*, **31**, 177-186 (1994)
- 3) T. D. Porter, M. J. Coon: Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **266**, 13469-13472 (1991)
- 4) C. Riesenman: Antidepressant drug interactions and the cytochrome P450 system: a critical appraisal. *Pharmacotherapy.*, **15**, 84S-99S (1995)
- 5) D. R. Nelson, T. Kamataki, D. J. Waxman, F. P. Guengerich, R. W. Estabrook, R. Feyereisen, F. J. Gonzalez, M. J. Coon, I. C. Gunsalus, O. Gotoh, K. Okuda, D. W. Nebert: The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA. Cell. Biol.*, **12**, 1-51 (1993)
- 6) T. Shimada, H. Yamazaki, M. Mimura, Y. Inui, F. P. Guengerich: Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 414-423 (1994)
- 7) F. P. Guengerich: Characterization of human cytochrome P450 enzymes. *FASEB. J.*, **6**, 745-748 (1992)
- 8) J. C. Kolars, P. Schmiedlin-Ren, J. D. Schuetz, C. Fang, P. B. Watkins: Identification of rifampin-inducible P450III_{A4} (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *J. Clin. Invest.*, **90**, 1871-1878 (1992)
- 9) R. A. McKinnon, W. M. Burgess, P. M. Hall, S. J. Roberts-Thomson, F. J. Gonzalez, M. E. McManus: Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. *Gut*, **36**, 259-267 (1995)
- 10) M. F. Hebert, J. P. Roberts, T. Prueksaritanont, L. Z. Benet: Bioavailability of cyclosporine with concomitant rifampin administration is markedly less than predicted by hepatic enzyme induction. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **52**, 453-457 (1992)
- 11) M. F. Paine, D. D. Shen, K. L. Kunze, J. D. Perkins, C. L. Marsh, J. P. McVicar, D. M. Barr, B. S. Gillies, K. E. Thummel: First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **60**, 14-24 (1996)
- 12) D. Y. Gomez, V. J. Wacher, S. J. Tomlanovich, M. F. Hebert, L. Z. Benet: The effects of ketoconazole on the intestinal metabolism and bioavailability of cyclosporine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **58**, 15-19 (1995)
- 13) M. F. Fromm, D. Busse, H. K. Kroemer, M. Eichelbaum: Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampin. *Hepatology.*, **24**, 796-801 (1996)
- 14) M. F. Paine, M. Khalighi, J. M. Fisher, D. D. Shen, K. L. Kunze, C. L. Marsh, J. D. Perkins, K. E. Thummel: Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 1552-1562 (1997)
- 15) A. Ghosal, H. Satoh, P. E. Thomas, E. Bush, D. Moore: Inhibition and kinetics of cytochrome P4503A activity in microsomes from rat, human, and cDNA-expressed human cytochrome P450. *Drug. Metab. Dispos.*, **24**, 940-947 (1996)
- 16) M. P. Ducharme, L. H. Warbasse, D. J. Edwards: Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **57**, 485-491 (1995)
- 17) H. H. Kupferschmidt, H. R. Ha, W. H. Ziegler, P. J. Meier, S. Krahenbuhl: Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **58**, 20-28 (1995)
- 18) D. G. Bailey, J. D. Spence, C. Munoz, J. M. Arnold: Interaction of citrus juices with felodipine and nifedipine [see comments] *Lancet.*, **337**, 268-269 (1991)
- 19) P. A. Soons, B. A. Vogels, M. C. Roosemalen, H. C. Schoemaker, E. Uchida, B. Edgar, J. Lundahl, A. F. Cohen, D. D. Breimer: Grapefruit juice and cimetidine inhibit stereoselective metabolism of nitrendipine in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **50**, 394-403 (1991)
- 20) S. K. Hukkinen, A. Varhe, K. T. Olkkola, P. J. Neuvonen: Plasma concentrations of triazolam are increased by concomitant ingestion of grapefruit juice. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **58**, 127-131 (1995)
- 21) D. G. Bailey, J. M. Arnold, C. Munoz, J. D. Spence: Grapefruit juice-felodipine interaction: mechanism, predictability, and effect of naringin. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **53**, 637-642 (1993)
- 22) D. G. Bailey, J. M. Arnold, H. A. Strong, C. Munoz, J. D. Spence: Effect of grapefruit juice and naringin on nisoldipine pharmacokinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **54**, 589-594 (1993)
- 23) W. K. Chan, L. T. Nguyen, V. P. Miller, R. Z. Harris: Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 3A4 by grapefruit juice and red wine. *Life. Sci.*, **62**, PL135-142 (1998)
- 24) V. J. Wacher, C. Y. Wu, L. Z. Benet: Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol. Carcinog.*, **13**, 129-134 (1995)
- 25) 鎌滝 哲也, 佐久間 勉: 薬物代謝における動物種差 チトクロームP450を中心として
ファルマシア **33**, 29-33 (1997)
- 26) A. Mahnke, D. Strotkamp, P. H. Roos, W. G. Hanstein, G. G. Chabot, P. Nef: Expression and inducibility of cytochrome P450 3A9 (CYP3A9) and other members of the CYP3A subfamily in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, **337**, 62-68 (1997)
- 27) H. Wang, H. Kawashima, H. W. Strobel: cDNA cloning of a novel CYP3A from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**, 157-162 (1996)
- 28) T. Kronbach, D. Mathys, M. Umeno, F. J. Gonzalez, U. A. Meyer: Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III_{A4}. *Mol. Pharmacol.*, **38**, 89-96 (1989)

- 29) C. M. Hunt, W. R. Westerkam, G. M. Stave: Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 275-283 (1992)
- 30) J. P. Desjardins, P. L. Iversen: Inhibition of the rat cytochrome P450 3A2 by an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 1608-1613 (1995)
- 31) G. R. Wilkinson: Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **24**, 475-490 (1996)
- 32) W. W. Shen: Cytochrome P450 monooxygenases and interactions of psychotropic drugs: a five-year update. *Int. J. Psychiatry. Med.*, **25**, 277-290 (1995)
- 33) R. Kitamura, K. Sato, M. Sawada, S. Itoh, M. Kitada, M. Komori, T. Kamataki: Stable expression of cytochrome P450III A7 cDNA in human breast cancer cell line MCF-7 and its application to cytotoxicity testing. *Arch. Biochem. Biophys.*, **292**, 136-140 (1992)
- 34) R. Martini, M. Murray: Participation of P450 3A enzymes in rat hepatic microsomal retinoic acid 4-hydroxylation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **303**, 57-66 (1993)
- 35) P. B. Watkins, D. K. Turgeon, P. Saenger, K. S. Lown, J. C. Kolars, T. Hamilton, K. Fishman, P. S. Guzelian, J. J. Voorhees: Comparison of urinary 6-beta-cortisol and the erythromycin breath test as measures of hepatic P450III A (CYP3A) activity. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **52**, 265-273 (1992)
- 36) P. J. Neuvonen, K. M. Jalava: Itraconazole drastically increases plasma concentrations of lovastatin and lovastatin acid. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **60**, 54-61 (1996)
- 37) 千葉 寛: チロクロームP450を介した薬物相互作用 ファルマシア, **31**, 922-926 (1995)
- 38) P. K. Honig, R. L. Woosley, K. Zamani, D. P. Conner, L. R. Cantilena Jr: Changes in the pharmacokinetics and electrocardiographic pharmacodynamics of terfenadine with concomitant administration of erythromycin. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **52**, 231-238 (1992)
- 39) S. A. Wrighton, P. Maurel, E. G. Schuetz, P. B. Watkins, B. Young, P. S. Guzelian: Identification of the cytochrome P-450 induced by macrolide antibiotics in rat liver as the glucocorticoid responsive cytochrome P-450p. *Biochemistry.*, **25**, 2171-2178 (1985)
- 40) K. O. Cooper, L. M. Reik, Z. Jayyosi, S. Bandiera, M. Kelley, D. E. Ryan, R. Daniel, S. A. McCluskey, W. Levin, P. E. Thomas: Regulation of two members of the steroid-inducible cytochrome P450 subfamily (3A) in rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, **301**, 345-354 (1993)
- 41) P. Schmiedlin-Ren, P. E. Benedict, W. O. Dobbins III, M. Ghosh, J. C. Kolars, P. B. Watkins: Cultured adult rat jejunal explants as a model for studying regulation of CYP3A. *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 905-918 (1993)
- 42) K. Debri, A. R. Boobis, D. S. Davies, R. J. Edwards: Distribution and induction of CYP3A1 and CYP3A2 in rat liver and extrahepatic tissues. *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 2047-2056 (1995)
- 43) A. Mahnke, P. H. Roos, W. G. Hanstein, G. G. Chabot: In vivo induction of cytochrome P450 CYP3A expression in rat leukocytes using various inducers. *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 1579-1582 (1996)
- 44) K. Venkatesan: Pharmacokinetic drug interactions with rifampicin. *Clin. Pharmacokinet.*, **22**, 47-65 (1992)
- 45) P. Heizmann, W. H. Ziegler: Excretion and metabolism of ¹⁴C-midazolam in humans following oral dosing. *Arzneim. Forsch.*, **31**, 2220-2223 (1981)
- 46) K. E. Thummel, D. O'Shea, M. F. Paine, D. D. Shen, K. L. Kunze, J. D. Perkins, G. R. Wilkinson: Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **59**, 491-502 (1996)
- 47) J. C. Gorski, S. D. Hall, D. R. Jones, M. VandenBranden, S. A. Wrighton: Regioselective biotransformation of midazolam by members of the human cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 1643-1653 (1994)
- 48) K. E. Thummel, D. D. Shen, T. D. Podoll, K. L. Kunze, W. F. Trager, C. E. Bacchi, C. L. Marsh, J. P. McVicar, D. M. Barr, J. D. Perkins, R. L. Carithers Jr: Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: II. Characterization of inter- and intraindividual hepatic CYP3A variability after liver transplantation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 557-566 (1994)
- 49) K. E. Thummel, D. D. Shen, T. D. Podoll, K. L. Kunze, W. F. Trager, P. S. Hartwell, V. A. Raisys, C. L. Marsh, J. P. McVicar, D. M. Barr, J. D. Perkins, R. L. Carithers Jr: Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 549-556 (1994)
- 50) P. C. Lee, S. L. Werlin: The induction of hepatic cytochrome P450 3A in rats: effects of age. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **210**, 134-139 (1995)
- 51) M. C. Wright, X. J. Wang, M. Pimenta, V. Ribeiro, A. J. Paine, M. C. Lechner: Glucocorticoid receptor-independent transcriptional induction of cytochrome P450 3A1 by metyrapone and its potentiation by glucocorticoid. *Mol. Pharmacol.*, **50**, 856-863 (1996)
- 52) H. J. Burger, J. D. Schuetz, E. G. Schuetz, P. S. Guzelian: Paradoxical transcriptional activation of rat liver cytochrome P-450 3A1 by dexamethasone and the antiglucocorticoid pregnenolone 16 alpha-carbonitrile: analysis by transient transfection into primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 2145-2149 (1992)
- 53) M. B. Telhada, T. M. Pereira, M. C. Lechner: Effect of dexamethasone and phenobarbital on run-on transcription rate and CYP3A mRNA concentration in rat liver: changes during development. *Arch. Biochem. Biophys.*, **298**, 715-725 (1992)
- 54) K. Burns, B. Duggan, E. A. Atkinson, K. S. Famulski, M. Nemer, R. C. Bleackley, M. Michalak: Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature*, **367**, 476-480 (1994)
- 55) M. Murray: Mechanisms of the inhibition of cytochrome P-450-mediated drug oxidation by therapeutic agents. *Drug. Metab. Rev.*, **18**, 55-81 (1987)
- 56) A. Varhe, K. T. Olkkola, P. J. Neuvonen: Oral triazolam is potentially hazardous to patients receiving systemic antimycotics ketoconazole or itraconazole. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **56**, 601-607 (1994)

- 57) K. T. Olkkola, J. T. Backman, P. J. Neuvonen: Midazolam should be avoided in patients receiving the systemic antimycotics ketoconazole or itraconazole. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **55**, 481-485 (1994)
- 58) S. A. Wrighton, B. J. Ring: Inhibition of human CYP3A catalyzed 1'-hydroxy midazolam formation by ketoconazole, nifedipine, erythromycin, cimetidine, and nizatidine. *Pharm. Res.*, **11**, 921-924 (1994)
- 59) T. Murakami, M. Sato, F. Higashikawa, A. Okochi, Y. Higashi, N. Yata, M. Takano: Hepatic clearance of ONO-5046, a novel neutrophil elastase inhibitor, in rats and in the rat perfused liver. *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 425-430 (1998)
- 60) T. Iwatsubo, H. Suzuki, Y. Sugiyama: Prediction of species differences (rats, dogs, humans) in the in vivo metabolic clearance of YM796 by the liver from in vitro data. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 462-469 (1997)
- 61) E. G. Schuetz, W. T. Beck, J. D. Schuetz: Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.*, **49**, 311-318 (1996)
- 62) K. S. Lown, R. R. Mayo, A. B. Leichtman, H. L. Hsiao, D. K. Turgeon, P. Schmiedlin-Ren, M. B. Brown, W. Guo, S. J. Rossi, L. Z. Benet, P. B. Watkins: Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **62**, 248-260 (1997)
- 63) M. Takano, R. Hasegawa, T. Fukuda, R. Yumoto, J. Nagai, T. Murakami: Interaction with P-glycoprotein and transport of erythromycin, midazolam, and ketoconazole in Caco-2 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **358**, 289-294 (1998)
- 64) D. J. Edwards, F. H. Bellevue 3rd, P. M. Woster: Identification of 6',7'-dihydroxybergamottin, a cytochrome P450 inhibitor, in grapefruit juice. *Drug. Metab. Dispos.*, **24**, 1287-1290 (1996)
- 65) K. Fukuda, T. Ohta, Y. Oshima, N. Ohashi, M. Yoshikawa, Y. Yamazoe: Specific CYP3A4 inhibitors in grapefruit juice: furocoumarin dimers as components of drug interaction. *Pharmacogenetics.*, **7**, 391-396 (1997)
- 66) A. Miniscalco, J. Lundahl, C. G. Regardh, B. Edgar, U. G. Eriksson: Inhibition of dihydropyridine metabolism in rat and human liver microsomes by flavonoids found in grapefruit juice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **261**, 1195-1199 (1992)
- 67) A. Johnston, J. T. Marsden, K. K. Hla, J. A. Henry, D. W. Holt: The effect of vehicle on the oral absorption of cyclosporin. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **21**, 331-333 (1986)
- 68) K. S. Lown, D. G. Bailey, R. J. Fontana, S. K. Janardan, C. H. Adair, L. A. Fortlage, M. B. Brown, W. Guo, P. B. Watkins: Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression [see comments] *J. Clin. Invest.*, **99**, 2545-2553 (1997)
- 69) T. Kantola, K. T. Kivisto, P. J. Neuvonen: Grapefruit juice greatly increases serum concentrations of lovastatin and lovastatin acid. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **63**, 397-402 (1998)
- 70) R. E. Benton, P. K. Honig, K. Zamani, L. R. Cantilena, R. L. Woosley: Grapefruit juice alters terfenadine pharmacokinetics, resulting in prolongation of repolarization on the electrocardiogram. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **59**, 383-388 (1996)
- 71) J. T. Backman, K. T. Olkkola, P. J. Neuvonen: Rifampin drastically reduces plasma concentrations and effects of oral midazolam. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **59**, 7-13 (1996)
- 72) T. M. Pereira, M. C. Lechner: Differential regulation of the cytochrome P450 3A1 gene transcription by dexamethasone in immature and adult rat liver. *Eur. J. Biochem.*, **229**, 171-177 (1995)
- 73) I. de-Waziers, P. H. Cugnenc, C. S. Yang, J. P. Leroux, P. H. Beaune: Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253**, 387-394 (1990)
- 74) J. C. Kolars, P. Schmiedlin-Ren, W. O. Dobbins III, J. Schuetz, S. A. Wrighton, P. B. Watkins: Heterogeneity of cytochrome P450III A expression in rat gut epithelia. *Gastroenterology.*, **102**, 1186-1198 (1992)
- 75) F. J. Gonzalez, B. J. Song, J. P. Hardwick: Pregnenolone 16 alpha-carbonitrile-inducible P-450 gene family: gene conversion and differential regulation. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 2969-2976 (1986)
- 76) F. Watanabe, M. Sato, A. Kato, T. Murakami, Y. Higashi, N. Yata: First-pass metabolism of ONO-5046 (N-[2-[4-(2,2-dimethylpropionyloxy) phenylsulfonlamino]benzoyl]aminoacetic acid), a novel elastase inhibitor, in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 392-396 (1997)
- 77) D. Good, C. D. Klaassen: Dosage-dependent absorption of cadmium in the rat intestine measured in situ. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **100**, 41-50 (1989)
- 78) G. Danan, V. Descatoire, D. Pessayre: Self-induction by erythromycin of its own transformation into a metabolite forming an inactive complex with reduced cytochrome P-450. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **218**, 509-514 (1981)
- 79) S. A. Wrighton, J. C. Stevens: The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.*, **22**, 1-21 (1992)
- 80) D. G. Bailey, J. R. Bend, J. M. Arnold, L. T. Tran, J. D. Spence: Erythromycin-felodipine interaction: magnitude, mechanism, and comparison with grapefruit juice. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **60**, 25-33 (1996)
- 81) P. B. Watkins, S. A. Murray, L. G. Winkelman, D. M. Heuman, S. A. Wrighton, P. S. Guzelian: Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochromes P-450. Studies in rats and patients. *J. Clin. Invest.*, **83**, 688-697 (1989)
- 82) Y. Krivoruk, M. T. Kinirons, A. J. Wood, M. Wood: Metabolism of cytochrome P4503A substrates in vivo administered by the same route: lack of correlation between alfentanil clearance and erythromycin breath test. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **56**, 608-614 (1994)
- 83) C. M. Stein, M. T. Kinirons, T. Pincus, G. R. Wilkinson, A. J. Wood: Comparison of the dapsone recovery ratio and the erythromycin breath test as in vivo probes of CYP3A activity in patients with rheumatoid arthritis receiving cyclosporine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **59**, 47-51 (1996)

- 84) S. A. Wrighton, W. R. Brian, M. A. Sari, M. Iwasaki, F. P. Guengerich, J. L. Raucy, D. T. Molowa, M. Vandenbranden: Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III_{A5} (HLp3) *Mol. Pharmacol.*, **38**, 207-213 (1990)
- 85) E. G. Schuetz, J. D. Schuetz, W. M. Grogan, A. Naray-Fejes-Toth, G. Fejes-Toth, J. Raucy, P. Guzelian, K. Gionela, C. O. Watlington: Expression of cytochrome P450 3A in amphibian, rat, and human kidney. *Arch. Biochem. Biophys.*, **294**, 206-214 (1992)
- 86) M. T. Kinirons, D. O'Shea, T. E. Downing, A. T. Fitzwilliam, L. Joellenbeck, J. D. Groopman, G. R. Wilkinson, A. J. Wood: Absence of correlations among three putative in vivo probes of human cytochrome P4503A activity in young healthy men. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **54**, 621-629 (1993)
- 87) S. A. Wrighton, M. VandenBranden, B. J. Ring: The human drug metabolizing cytochromes P450. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **24**, 461-473 (1996)
- 88) B. D. Haehner, J. C. Gorski, M. Vandenbranden, S. A. Wrighton, S. K. Janardan, P. B. Watkins, S. D. Hall: Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Mol. Pharmacol.*, **50**, 52-59 (1996)
- 89) K. T. Olkkola, K. Aranko, H. Luurila, A. Hiller, L. Saarnivaara, J. J. Himberg, P. J. Neuvonen: A potentially hazardous interaction between erythromycin and midazolam. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **53**, 298-305 (1993)
- 90) S. Yee: In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. *Pharm. Res.*, **14**, 763-766 (1997)
- 91) M. R. Franklin, R. W. Estabrook: On the inhibitory action of mersalyl on microsomal drug oxidation: a rigid organization of the electron transport chain. *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**, 318-329 (1971)
- 92) T. Aoyama, S. Yamano, D. J. Waxman, D. P. Lapenson, U. A. Meyer, V. Fischer, R. Tyndale, T. Inaba, W. Kalow, H. V. Gelboin, F. J. Gonzalez: Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 III_A gene product that is differentially expressed in adult human liver. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of cDNA-expressed hPCN1 and hPCN3 for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine. *J. Biol. Chem.*, **264**, 10388-10395 (1989)
- 93) K. T. Kivisto, G. Bookjans, M. F. Fromm, E. U. Griese, P. Munzel, H. K. Kroemer: Expression of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 in human duodenal tissue. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **42**, 387-389 (1996)
- 94) K. S. Lown, J. C. Kolars, K. E. Thummel, J. L. Barnett, K. L. Kunze, S. A. Wrighton, P. B. Watkins: Interpatient heterogeneity in expression of CYP3A4 and CYP3A5 in small bowel. Lack of prediction by the erythromycin breath test [published erratum appears in *Drug Metab Dispos* 1995 Mar,23(3):following table of contents] *Drug. Metab. Dispos.*, **22**, 947-955 (1994)
- 95) 東 純一: 「困ったクスリたち」とのつきあい方 月刊薬事, **40**, 1573-1579 (1998)
- 96) K. Ito, T. Iwatsubo, S. Kanamitsu, Y. Nakajima, Y. Sugiyama: Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from in vitro data on metabolism, together with binding and transport. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 461-499 (1998)

- 97) T. Iwatsubo, N. Hirota, T. Ooie, H. Suzuki, Y. Sugiyama: Prediction of in vivo drug disposition from in vitro data based on physiological pharmacokinetics. *Biopharm. Drug. Dispos.*, **17**, 273-310 (1996)
- 98) T. Iwatsubo, N. Hirota, T. Ooie, H. Suzuki, N. Shimada, K. Chiba, T. Ishizaki, C. E. Green, C. A. Tyson, Y. Sugiyama: Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacol. Ther.*, **73**, 147-171 (1997)
- 99) J. H. Lin, M. Chiba, S. K. Balani, I. W. Chen, G. Y. Kwei, K. J. Vastag, J. A. Nishime: Species differences in the pharmacokinetics and metabolism of indinavir, a potent human immunodeficiency virus protease inhibitor. *Drug. Metab. Dispos.*, **24**, 1111-1120 (1996)
- 100) J. B. Houston: Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 1469-1479 (1994)
- 101) J. R. Tata: Co-ordination between membrane phospholipid synthesis and accelerated biosynthesis of cytoplasmic ribonucleic acid and protein. *Biochem. J.*, **116**, 617-630 (1970)
- 102) Z. Jayyosi, M. Muc, J. Erick, P. E. Thomas, M. Kelley: Catalytic and immunochemical characterization of cytochrome P450 isozyme induction in dog liver. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **31**, 95-102 (1996)
- 103) 杉山 雄一: 薬物間相互作用の予測: ヒト肝およびリコンビナント酵素を用いた定量的予測法の構築 第4回 日光カンファレンス記録集 (1997)
- 104) D. Matthew, B. Brennan, K. Zomorodi, J. B. Houston: Disposition of azole antifungal agents. I. Nonlinearities in ketoconazole clearance and binding in rat liver. *Pharm. Res.*, **10**, 418-422 (1993)
- 105) 澤田 康文: 薬物間相互作用の重篤度の定量的予測に関する研究, わが国における臨床試験の実施と医療用添付文書中相互作用欄の更なる充実に関する提案 薬局, **49**, 123-148 (1998)