

抗てんかん薬ゾニサミドの代謝および
相互作用に関する研究

2003年

仲佐啓詳

目次

| | |
|---|----|
| 緒言 | 1 |
| 第1章 ラット肝の <i>in vitro</i> におけるゾニサミド代謝 | 4 |
| 第1節 ラット肝の <i>in vitro</i> におけるSMAPの生成 | 6 |
| 第2節 嫌气的条件下における代謝 | 10 |
| 第3節 好气的条件下における代謝 | 24 |
| 第4節 反応速度論的解析 | 29 |
| 第5節 小括 | 31 |
| 実験の部 | 32 |
| 第2章 ゾニサミド代謝に関与するヒト肝P450分子種 | 36 |
| 第1節 ヒト肝ミクロゾームによるゾニサミド代謝 | 37 |
| 第2節 発現ヒトP450によるゾニサミド代謝 | 51 |
| 第3節 小括 | 55 |
| 実験の部 | 56 |
| 第3章 ヒトにおける代謝的相互作用の予測 | 59 |
| 第1節 ヒト肝ミクロゾームによるゾニサミド代謝の薬物相互作用 | 60 |
| 第2節 <i>in vitro</i> データから <i>in vivo</i> での相互作用の発現の予測 | 66 |
| 第3節 小括 | 70 |
| 実験の部 | 71 |
| 総括 | 73 |
| 参考文献 | 75 |
| 論文目録 | 88 |
| 主査および副査名 | 89 |
| 謝辞 | 90 |

緒 言

てんかんは『種々の成因によってもたらされる慢性の脳疾患であって、大脳ニューロンの過剰な発射から由来する反復性の発作（てんかん発作）を主徴とし、それに変異に富んだ臨床ならびに検査所見の表出が伴う。』とWHO国際てんかん用語委員会によって定義されている [1]。つまり、てんかんとは（1）慢性の脳疾患、（2）大脳ニューロンの過剰な放電、（3）反復性の発作（てんかん発作）の3条件を満たす状態をさすといえる。てんかんの発現については、主に（1）抑制性神経伝達系の障害、（2）興奮性神経伝達系の増強、（3）イオンチャンネルの障害による神経細胞膜の興奮性の増大が関与すると考えられているが、発作焦点での高頻度な発射の原因についてはまだ明確な説明がつかない。また、最近のアメリカてんかん協会の調査によると、てんかんの有病率は人口の約1%以上であると考えられている。

てんかん発作に対して適切な治療を行なわないと、けいれんが持続し、重積発作の状態となり、不可逆的な脳障害、てんかんの増悪を引き起こし、さらには呼吸不全・心不全・肺浮腫などをきたし、致命的経過をたどる。現状において、てんかんの治療として、臨床発作の抑制ないし発作頻度を減少させることを目的に、対症療法としての抗てんかん薬を用いた薬物療法が行なわれる。適切な薬物療法によりおよそ80%の患者の発作がコントロールされ得るといわれている [2]。したがって、てんかん治療における薬物療法の意義は非常に大きい。

適切な薬物療法のポイントは、病型にあった抗てんかん薬の選択と、その患者における適切な投与量の決定にある。現在、てんかんに関する国際的な分類は、症状に基づく『てんかん発作の分類』 [3] と慢性の脳障害としててんかん自体の『てんかんの分類』 [4] の2通りがある。これらの臨床発作型と脳波所見に基づいて抗てんかん薬の選択がなされる。治療薬は単剤で用いるのが原則であるが、発作型は多くの患者で単一ではなく、複数の薬剤が併用されることが多く、特に難治性てんかんに対しては多剤併用される場合が多いのが現実である。したがって、薬物相互作用の報告も多く見受けられる [5-7]。

また、抗てんかん薬の治療血中薬物濃度域は一般に狭く、副作用・中毒発現血中濃度域と近接しており、また、体内動態および発作発現の個人差が大きく、特に非線形体内動態を示す薬物があることなどから、抗てんかん薬を臨床使用する場合は Therapeutic Drug Monitoring (TDM) を行なうことが望ましいとされている。TDM は投与量の最適化、中毒原因薬物の同定、コンプライアンスの確認等に効果を発揮する

が、副作用・相互作用の発現の予測にはほとんど無力と言わざるをえない。したがって、有効治療域の狭い抗てんかん薬の有効かつ安全な薬物療法のためには、薬物投与前に既存情報から薬物相互作用を予測し回避することが重要である。

薬物相互作用は、その発現機序から薬物動態学的相互作用と薬力学的相互作用に分類される。社会問題ともなった抗ウイルス薬ソリブジンとフルオロウラシル系抗腫瘍薬の併用時の骨髄抑制による死亡例 [8] や、抗アレルギー薬テルフェナジンとマクロライド系抗生物質の併用による重篤なQT延長、心室性不整脈による死亡に至るおそれのある副作用例 [9] は、薬物の代謝過程における相互作用であり、薬物動態学的相互作用である。多くの薬物相互作用は、薬物動態学的相互作用であり、中でも代謝に起因する相互作用の重要性が指摘されている。そこで、薬物の代謝について詳細に解明することは、薬物相互作用を回避する上で非常に有益な情報となる。

ゾニサミドは国内で 1974 年に合成された抗てんかん薬で、既存の抗てんかん薬が有するウレイド骨格を持たず、薬物としては新規なベンズイソキサゾール環を構造に持つ抗てんかん薬である [10]。既存の抗てんかん薬服用下で発作が抑制されない部分発作、全般発作患者を対象に行なわれた臨床試験においてゾニサミドの有効性が示され

[11-15]、1989 年に国内で承認され臨床に供されるようになった。承認後も、複数の発作型が混在するウエスト症候群やレンノックス・ガストー症候群などの難治性てんかんに対する有効性を示す報告 [16] や既存の抗てんかん薬との併用投与でなく、ゾニサミド単剤投与の有効性を示す報告 [17-18] が数多くなされており、ゾニサミドの抗てんかん薬としての有効性が改めて認められている [19]。

しかし一方で、ゾニサミドと他の抗てんかん薬との併用により、ゾニサミドあるいは併用抗てんかん薬の体内動態が変化したとする報告がなされている。ゾニサミドの体内動態が変化した症例として、Ojemann ら [20] は、ゾニサミドとカルバマゼピンやフェニトインの併用により、ゾニサミドの消失半減期が短縮することを、また、八木ら [21] は、ゾニサミドとカルバマゼピンの併用からカルバマゼピンを休薬することにより、血中ゾニサミド濃度が上昇することを、同様に福島ら [22] は、バルプロ酸の併用からバルプロ酸を休薬することにより、血中ゾニサミド濃度が上昇することを報告している。また、併用薬の体内動態が変化した症例として、香坂ら [23]、田川ら [24] および Mimaki ら [25] は、ゾニサミドとフェニトインの併用により血中フェニトイン濃度が上昇することを、一方、樋口ら [26] は、ゾニサミドとフェニトインの併用により血中フェニトイン濃度が低下することを報告している。このように、ゾニサミドと併用薬の薬物相互作用が報告されてはいるが、その機序については詳細にはされていない。

本研究では、てんかんの薬物療法の適正化を目標に、新規抗てんかん薬ゾニサミドによる薬物相互作用の可能性を予測し、回避することを目的に、ラットおよびヒト肝マイクロゾームや発現ヒトP450を用い *in vitro* においてゾニサミド代謝について検討を行った。

1) ゾニサミドおよび代謝物 2-スルファモイルアセチルフェノール (SMAP) の定量法を HPLC を用いて確立した。さらに、ラット肝におけるゾニサミド代謝について、反応の特性および関与する酵素を検討した。

2) ヒト肝マイクロゾームおよびワクシニア-Hep G2 発現系で発現したヒトP450 を用いて、ゾニサミド代謝に関与するヒトP450 分子種について検討した。

3) ヒト肝マイクロゾームを用いた *in vitro* 代謝実験系における種々代謝阻害剤の影響を検討し、得られた結果から *in vivo* での薬物併用時におけるゾニサミドの代謝クリアランスの変化を算出し相互作用の可能性について考察した。

第1章 ラット肝の *in vitro* におけるゾニサミド代謝

ゾニサミドはラットに経口投与後、未変化体の他、ベンズイソキサゾール環の開環体である2-スルファモイルアセチルフェノール (SMAP) の硫酸抱合体、カルボキシル体、およびアセチル化体として尿中に排泄されることが、吉田ら [27] により薄層クロマトグラフィー/二次イオン質量分析法 (TLC/SIMS) による尿中排泄物の解析により報告されている。同様に、松本ら [28] によりイヌ、サルにおける尿中代謝物の検討もなされ、これら実験動物におけるゾニサミドの推定代謝経路が松本らにより Fig. 1のよう示されている。さらに尿中の排泄の約40%が SMAP であり、これがゾニサミドの主代謝物であることが明らかとなっている [28]。また、Stiff と Zemaitis もラットにおいて同様の結果を報告しており [29]、ベンズイソキサゾール環の開裂が代謝的に生じることが明らかとされたが、本反応に関与する代謝酵素についての詳細は明らかにされていない。

そこで本章では、ラットにおけるゾニサミドの還元的 SMAP 生成に関与する代謝酵素について、薬物代謝の主要臓器である肝に注目し *in vitro* において検討を行なった。

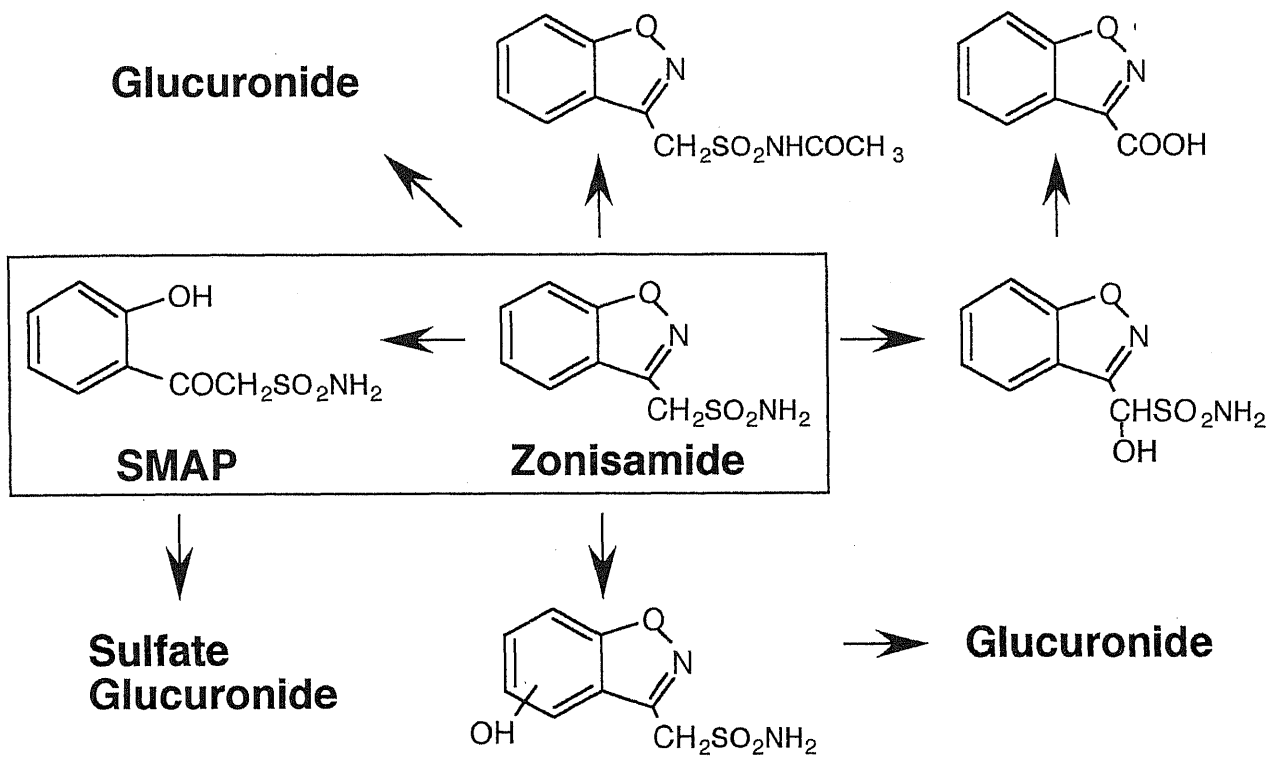


Fig. 1 Metabolic pathways of zonisamide

第1節 ラット肝の *in vitro* における SMAP の生成

ラット肝より常法に従い肝ミクロゾームおよびサイトゾールを調製し、これらを酵素源とした *in vitro* の反応系でゾニサミドを基質とし NADPH の存在下で検討した。尚、検討に先立ち HPLC による定量法を検討した。

HPLC による分離定量

【結果・考察】

ゾニサミドおよび SMAP をジクロロメタンで抽出後、リン酸緩衝液 (0.1 M、pH 4.0) : アセトニトリル : 2-プロパノールの 15 : 5 : 1 の混液を移動相とし、Inertsil ODS-2 カラムを用いた逆相 HPLC により分離後 260 nm でモニターしたところ、ゾニサミドと SMAP ピークの良好な分離が得られた。ブロムワレリル尿素は、SMAP およびゾニサミドの溶出後に溶出し、内部標準物質として使用できることを確認した。

そこで、ゾニサミドと SMAP を添加したラット肝ミクロゾーム 0.5 mg を含む *in vitro* 反応溶液から抽出後のクロマトグラムも、それぞれのピークの良好な分離が認められた (Fig. 2)。また、薬物未添加のラット肝ミクロゾーム 0.5 mg を含む *in vitro* 反応溶液から抽出後のクロマトグラムでは、SMAP、ゾニサミド、ブロムワレリル尿素の溶出時間には妨害ピークを認めなかった。

本分離条件において検討した 800 nmol/mL までの範囲では、良い直線性を確認した。また、定量限界はチャートのノイズの 3 倍の 2 nmol/mL とした。日内および日間変動の変動係数はそれぞれ 4 % 以下であった。

定量の再現性、溶出時間などから、*in vitro* における SMAP の定量に本方法が利用可能であると考えられた。

細胞画分および酸素濃度の違いによる SMAP 生成の比較

【結果・考察】

SD 系雄性ラット肝ミクロゾームおよびサイトゾールを用い、ゾニサミドを基質とし NADPH 存在下で好氣的条件下および嫌氣的条件下において、37 °C で 20 分間インキュベートしたときの SMAP の生成量を測定した (Table 1)。サイトゾールを用いた場合は好氣的、嫌氣的のどちらの条件においても SMAP の生成は認められなかった。一方、

マイクロゾームを用いた場合は、薬物未処理のラット肝マイクロゾームでは、好氣的条件下では SMAP の生成は認められなかったものの、嫌氣的条件下において SMAP の生成が認められた。さらに、フェノバルビタールやデキサメサゾンで処理したラット肝マイクロゾームにおいては、顕著な SMAP 生成の増加が認められた。また、このとき好氣的条件下においても SMAP の生成が認められ、これは薬物未処理ラット肝マイクロゾームの嫌氣的条件下の SMAP 生成量よりも有意に多いものであった。

ゾニサミドは、NADPH を電子供与体としたとき、酵素源としてマイクロゾームを用いた場合に活性が認められ、サイトゾールを用いた場合には活性が認められなかったことから、ゾニサミドはマイクロゾーム画分に存在する酵素により SMAP に代謝されることが示唆された。また、この酵素はフェノバルビタールやデキサメサゾン誘導性であることが示された。さらに、ゾニサミドから SMAP への反応は酸素濃度の影響を受け、好氣的条件下より嫌氣的条件下において高い活性を示すことから、本反応に酸素が阻害的に作用することが示された。また、フェノバルビタールやデキサメサゾン前処理ラット肝マイクロゾームの好氣的条件下における SMAP 生成活性は、薬物未処理ラット肝マイクロゾームの嫌氣的条件下での活性よりも有意に高く、好氣的条件下において本反応に関与する酵素は嫌氣的条件下において関与する酵素と異なる可能性も考えられた。

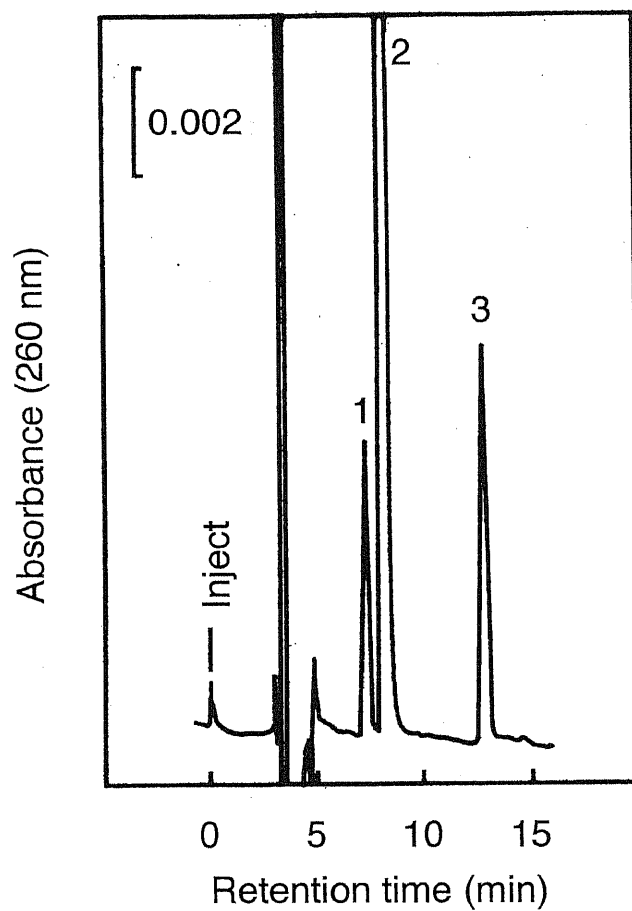


Fig. 2 High-performance liquid chromatogram of zonisamide metabolite formed by rat liver microsomes.

1, SMAP; 2, zonisamide; 3, internal standard (bromvalerylurea)

Table 1 Formation of SMAP from zonisamide in rat liver subcellular fractions

| Fractions | n | SMAP formation | |
|-----------------------------|---|----------------|-------------|
| | | Aerobic | Anaerobic |
| | | nmol/mg/min | |
| Cytosol (untreated) | 3 | < 0.02 | < 0.02 |
| Microsomes (untreated) | 3 | < 0.02 | 0.50 ± 0.13 |
| Microsomes (PB pretreated) | 3 | 1.42 ± 0.36 | 3.64 ± 0.49 |
| Microsomes (DEX pretreated) | 3 | 1.82 ± 0.49 | 7.55 ± 0.56 |

Cytosol and microsomes were prepared from livers of male SD rat. Pretreatment of rats were indicated in parentheses. PB and DEX represent phenobarbital and dexamethasone, respectively. Each value represents the mean ± SD of three animals.

第2節 嫌氣的条件下におけるラット肝ミクロゾームによるゾニサミド代謝

ラット肝ミクロゾーム画分の NADPH を電子供与体とする酵素により、嫌氣的条件下においてゾニサミドは SMAP に代謝されることが明らかとなったことから、本反応に
関与する酵素の同定を目的に検討を行なった。

【結果・考察】

in vitro における至適反応条件

嫌氣的条件下におけるゾニサミドから SMAP への *in vitro* における代謝反応の至適条件を、薬物未処理ラット肝ミクロゾームを用い電子供与体として NADPH を用いて検討した (Fig. 3)。ゾニサミドは反応時間 20 分で、反応溶液中のミクロゾーム蛋白濃度 2 mg/mL まで SMAP 生成量は直線的に増加した (Fig. 3-A)。また、ミクロゾーム蛋白濃度 1 mg/mL で、反応時間 20 分まで時間に比例して SMAP 生成量は増加したが、反応時間 40 分では生成量にやや頭打ちが認められた (Fig. 3-B)。また、ミクロゾーム蛋白量 1 mg/mL、反応時間 20 分で、リン酸緩衝液およびトリス塩酸緩衝液を用いた pH 6.5~9.0 においては、リン酸緩衝液を用いた pH 7.0 のときに最大活性を示した (Fig. 3-C)。ラット肝ミクロゾームを用いた *in vitro* の反応条件を、リン酸緩衝液による pH 7.0、ミクロゾーム蛋白濃度 1 mg/mL、反応時間 20 分で行なうこととした。

cofactor 要求性

薬物未処理ラット肝ミクロゾームを用い、嫌氣的条件下において電子供与体として NADPH または NADP の 1 mM 存在下およびそれぞれ 1 mM 共存下において SMAP 生成活性を測定したところ、NADH を用いた場合より NADPH を用いた場合が約 4 倍高い活性を示した (Fig. 4)。また、NADPH と NADH 共存下においても SMAP 生成活性は、NADPH 1 mM のみの場合とほぼ同等の活性を示した。また、80°C で 10 分間熱処理したミクロゾームでは活性が認められなかった (データ未提示)。

ミクロゾーム画分の主な構成成分である小胞体膜には、NADPH や NADH から供給される還元力を多数の末端酵素に伝える電子伝達ネットワークが形成されており、これは、酸化還元ポテンシャルを化学ポテンシャルに変換する呼吸鎖電子伝達系の整然とした構成とは異なり小胞体電子伝達系の特徴である。それゆえ、小胞体膜上の電子伝達経路は機能的に役割分担されているものの、補償的や相乗的に働くこともあることが知ら

れている [30]。しかし、ゾニサミドを基質とした場合においては、NADH synergism 現象は認められなかったことから、ゾニサミドの還元的 SMAP 生成反応は、ミクロゾーム中の NADPH を電子供与体とする熱不安定な酵素により触媒されていることが明らかになった。

阻害剤の影響

薬物未処理ラット肝ミクロゾームを用いて、SMAP 生成反応に対する各種阻害剤の影響を検討した結果を Fig. 5 に示した。SMAP 生成活性はシメチジン、ケトコナゾール、一酸化炭素により顕著に阻害された。さらに、シメチジンでは濃度依存的な阻害が観察された。シメチジンは、その構造中のイミダゾール基の窒素原子が、P450 のヘム鉄に配位することにより P450 による代謝阻害を示す [31] こと、また、ケトコナゾールは CYP3A の選択的阻害剤である [32] こと、さらに一酸化炭素による代謝阻害は P450 の代表的特徴であることなどから、ゾニサミドから SMAP への反応には肝ミクロゾームの P450 が関与していることが強く示唆された。

一方、SKF 525-A は SMAP 生成活性を顕著に増大した。SKF 525-A は P450 の代謝阻害剤として広く知られているが、一方で一酸化炭素-P450 複合体の還元を促進すること [33] やアゾ化合物の P450 系による還元が SKF 525-A により活性化されること [34] が報告されていることから、ゾニサミドの還元的 SMAP 生成は、ゾニサミド-P450 複合体に電子が導入され、その電子によるゾニサミドの還元が生じるものと考えられた。

性差

SMAP 生成活性の性差の有無について検討した結果を、Table 2 に示した。雌雄の薬物未処理ラット肝ミクロゾームにより、嫌氣的条件下においてゾニサミドは SMAP に代謝されたが、その活性は雄が雌より有意に高く、約 4 倍高い活性を示した。これは、雌雄間の総 P450 比含量の差以上の違いであった。

ラットには雄特異的な CYP2C11、雌特異的な CYP2C12 の発現 [35] や、雄>雌である CYP3A の発現量差 [36] などの、P450 の質的・量的な性差のあることが知られている。SMAP 生成活性には雌雄間で顕著な性差があることが明らかとなったことから、性差の存在する P450 分子種の関与の可能性が示唆された。

誘導剤の影響

P450 の誘導剤 [37] として知られているフェノバルビタール、プレグネノロン 16- α カーボニトリル、3-メチルコランズレン、エタノール、イミダゾールの影響を Fig. 6 に示した。フェノバルビタール前処理およびプレグネノロン 16- α カーボニトリル前処理ラット肝マイクロゾームにおいて顕著な SMAP 生成活性の増加が認められた。一方、イミダゾール、エタノール、3-メチルコランズレンで前処理したラット肝マイクロゾームでは有意な変化は認められなかった。

また、SMAP 生成活性を測定したマイクロゾームの抗 P450 抗体（抗 CYP2B1 抗体、抗 CYP2C11 抗体、抗 CYP3A4 抗体）を用いたイムノブロット分析の結果を Fig. 7 に示した。SMAP 生成活性の高いフェノバルビタールおよびプレグネノロン 16- α カーボニトリル前処理ラット肝マイクロゾームでは、プレグネノロン 16- α カーボニトリル前処理では CYP3A のバンドが、またフェノバルビタール前処理では CYP3A と CYP2B1 のバンドが強く現われ、それぞれ酵素誘導されていることが確認された。一方、雄特異的に発現している CYP2C11 は用いた誘導剤すべてにおいて未処理に比較しバンドの発色強度は弱く、誘導はされず単位タンパク当たりではむしろ減少していることが確認された [38]。

酵素活性 (Fig. 6) とイムノブロット分析 (Fig. 7) の結果から、CYP3A のタンパク量の挙動と SMAP 生成活性は相関していることから、ゾニサミドから SMAP への代謝には CYP3A が関与している可能性が考えられた。

SMAP 生成活性と P450 分子種含量との相関性

前項の活性測定に使用した誘導剤前処理ラット肝マイクロゾーム中の P450 分子種含量を抗 P450 抗体（抗 CYP2B1 抗体、抗 CYP2C11 抗体、抗 CYP3A4 抗体）を用いたイムノブロット分析により定量し、SMAP 生成活性との相関性を検討し結果を Fig. 8 に示した。CYP2B1 および CYP2C11 と SMAP 生成活性との間には有意な正の相関は認められなかった。一方、CYP3A1/2 と SMAP 生成活性との間には $r^2: 0.901$ と有意な正の相関が認められた。Fig. 7 は誘導剤処理群の中の各 1 個体の結果であるが、全個体のイムノブロット分析の Fig. 8 の結果からも、ゾニサミドから SMAP への代謝には CYP3A が関与している可能性が示唆された。

トリアセチルオレアンドマイシンによる誘導効果

プレグネノロン 16- α カーボニトリル同様 CYP3A を誘導することが知られている、トリアセチルオレアンドマイシンおよびデキサメサゾン前処理の影響を検討した結果を

Fig. 9 に示した。

トリアセチルオレアンドマイシンは CYP3A の誘導剤であるとともに、自身の代謝物の CYP3A に対する親和性の高さから安定な CYP3A - 代謝物複合体を形成することにより、CYP3A の触媒活性を阻害することが知られている [39, 40]。さらに、その複合体は、*in vitro* においては P450 をフェリシアン化カリウムにより酸化することにより元の活性な P450 酵素に復帰することが知られている [39, 40]。

トリアセチルオレアンドマイシン前処理ラット肝マイクロゾームでは、フェリシアン化カリウム処理により P450 比含量および SMAP 生成活性がフェリシアン化カリウム未処理に比較し有意に増加し、デキサメサゾン前処理ラット肝マイクロゾームのレベルに達したことから、ゾニサミドから SMAP への代謝には CYP3A が関与している可能性が示唆された。

精製酵素による活性

フェノバルビタール前処理ラット肝マイクロゾームより精製した CYP2B1 およびプレグネロン 16 α -カーボニトリル前処理ラット肝マイクロゾームより精製した CYP3A2 を用いた再構成系による SMAP 生成活性の結果を Table 3 に示した。ジラウリルフォスファチジルコリン (DLPC) を脂質とし、ラット肝より精製した NADPH-P450 還元酵素 (fp2) およびチトクローム b5 (b5) を添加した再構成系において、CYP2B1 より 5 倍以上の SMAP 生成活性を示した。CYP3A2 がゾニサミドの還元的 SMAP 生成活性を有することが明らかとなった。

抗体の影響

抗 CYP2B1 抗体、抗 CYP3A4 抗体および抗 fp2 抗体の、ラット肝マイクロゾームによるゾニサミドの還元的 SMAP 生成活性に対する影響を検討した結果を Fig. 10 に示した。

抗 CYP2B1 抗体では顕著な阻害は認められなかったが、抗 CYP3A4 抗体および抗 fp2 抗体により、ほぼ同程度にゾニサミドの還元的 SMAP 生成活性が濃度依存的に阻害され、最高濃度添加により約 80% の阻害が認められた。したがって、ラット肝マイクロゾームにおけるゾニサミドの還元的 SMAP 反応には、CYP3A 酵素が主に関与していることが明らかとなった。

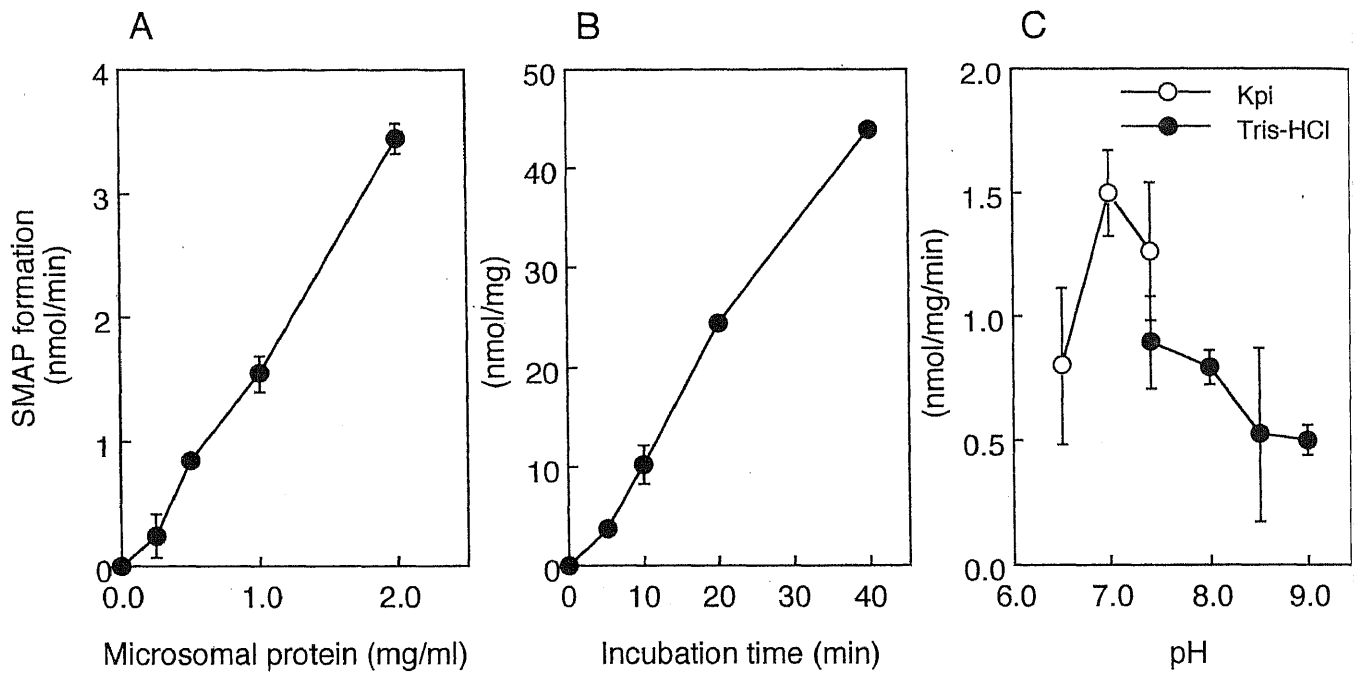


Fig. 3 Effects of microsomal protein concentration, incubation time and pH of reaction mixture on SMAP formation

Effects of microsomal protein added (A), incubation time (B) and pH (C) on the formation of SMAP from zonisamide were measured under anaerobic conditions.

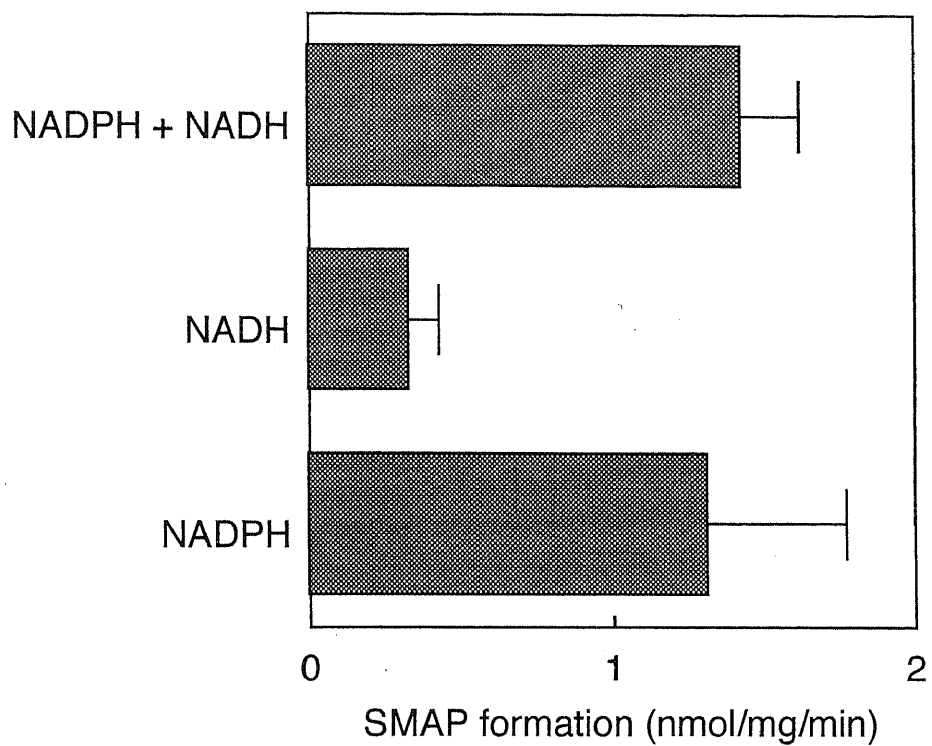


Fig. 4 Cofactor requirement for SMAP formation in rat liver microsomes
SMAP producing activities in rat liver microsomes under anaerobic conditions were measured in the presence of NADH (1 mM) and /or NADPH (1 mM). Each value represents mean \pm SD of triplicate determinations.

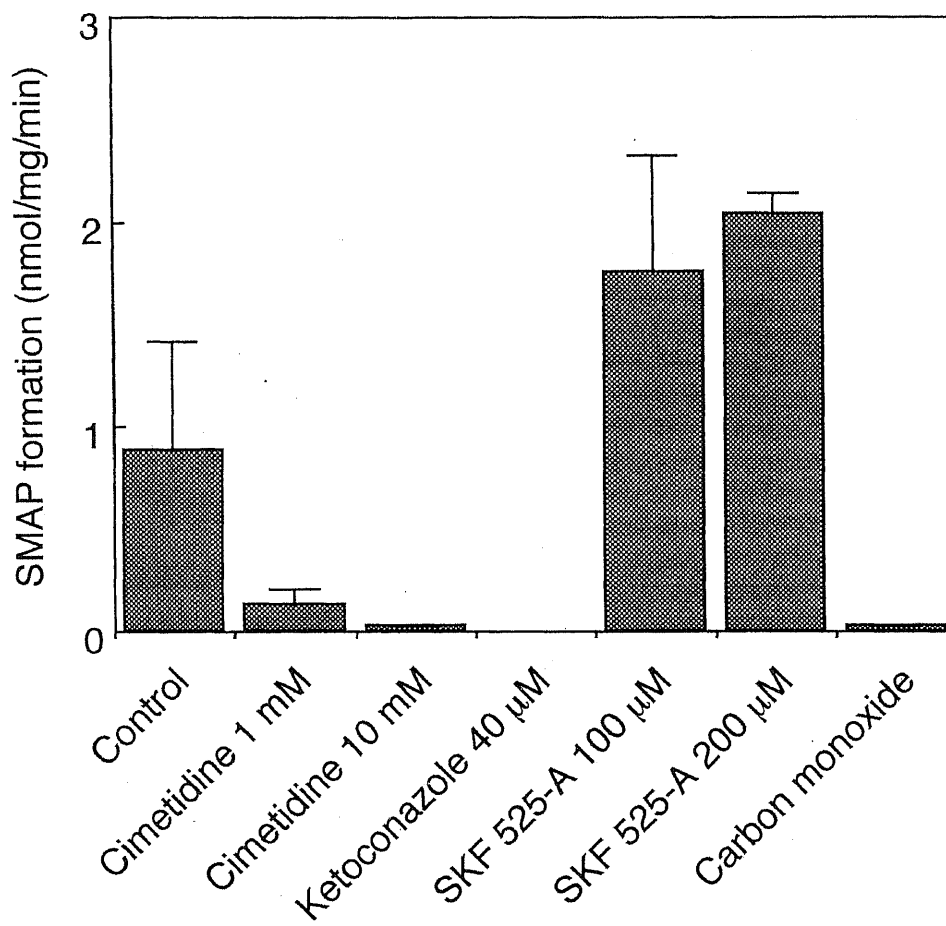


Fig. 5 Effects of various agents on SMAP formation in rat liver microsomes under anaerobic conditions

Each value represents mean \pm SD of two to seven determinations.

Table 2 Sex difference on the SMAP formation from zonisamide in rat liver microsomes

| Sex | P450 (nmol/mg) | SMAP formation (nmol/mg/min) |
|--------|-------------------|---------------------------------|
| Male | 1.15 ± 0.28 | 0.93 ± 0.11 |
| Female | 0.75 ± 0.12* | 0.24 ± 0.04** |

* , significantly different $P < 0.05$

** , significantly different $P < 0.01$

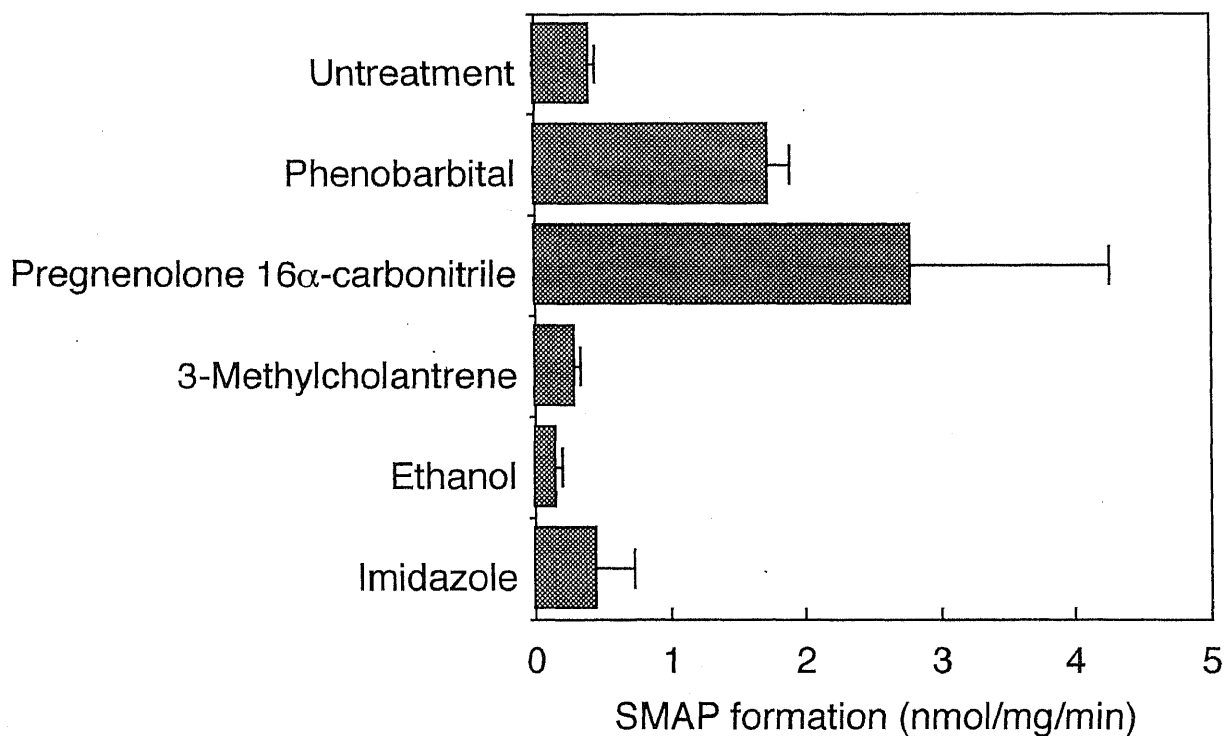


Fig. 6 Effect of pretreatment of rats with various inducers of P450 on SMAP formation from zonisamide in liver microsomes under anaerobic conditions. Animals were pretreated with phenobarbital (80 mg/kg, ip) for 5 days, pregnenolone 16 α -carbonitrile (50 mg/kg, ip) for 5 days, imidazole (200 mg/kg, ip) for 4 days, ethanol (10 % ethanol added to drinking water) for 5 days, and 3-methylcholanthrene (25 mg/kg, ip) on second, fourth and sixth days before sacrifice. Each value represents mean \pm SD of two or three different animals.

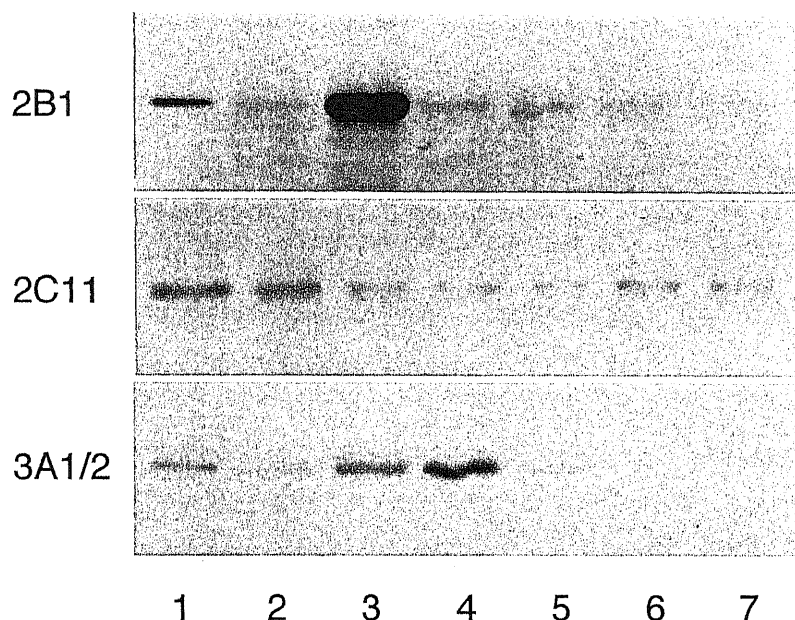


Fig. 7 Immunoblot analysis of liver microsomes of rats pretreated with various inducers of P450

Immunoblot analyses of CYP2B1, CYP2C11 and CYP3A1/2 were performed with anti-CYP2B1, anti-CYP2C11 and anti-CYP3A4 antibodies, respectively. Lanes 1 and 2 contained purified P450 enzymes and liver microsomes from untreated rats, respectively. The amounts of CYP2B1, CYP2C11 and CYP3A1/2 applied were 0.09, 0.05 and 0.11 pmol, respectively. Lanes 3-7 contained liver microsomes of rats pretreated with phenobarbital, pregnenolone 16 α -carbonitrile, 3-methyl-cholanthrene, ethanol and imidazole, respectively. The amounts of protein applied for CYP2B1, CYP2C11 and CYP3A1/2 were 16, 0.2 and 4 μ g, respectively.

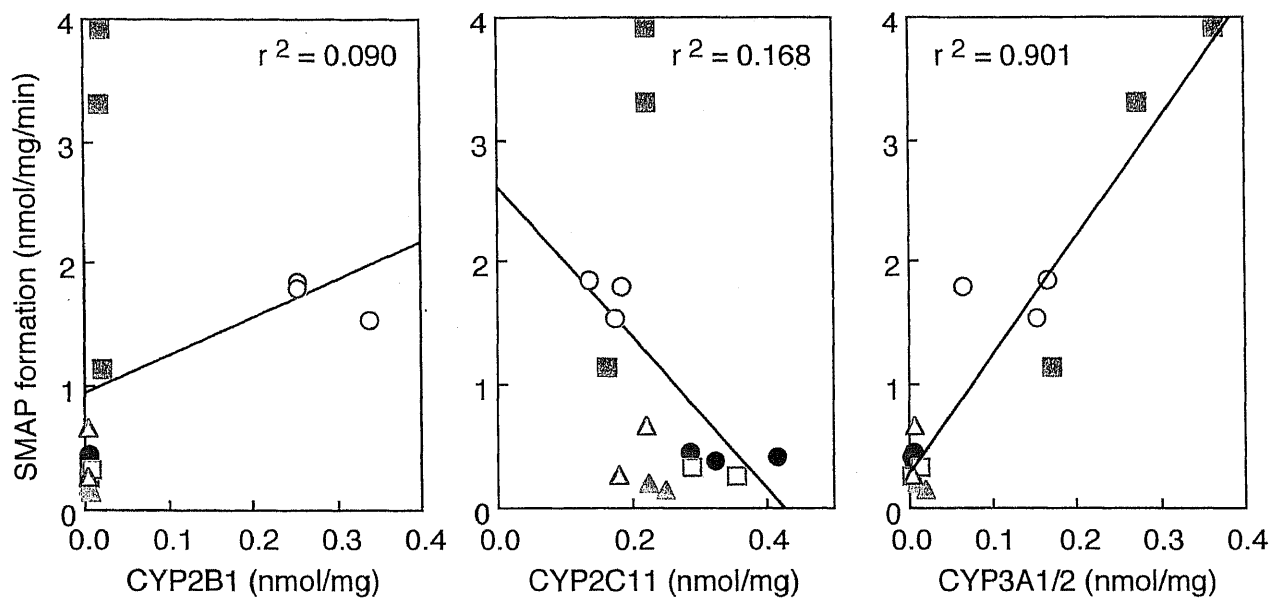


Fig. 8 Correlation of the SMAP-producing activity with the amount of CYP2B1, CYP2C11 and CYP3A1/2 in rat liver microsomes

Immunochemical determinations of CYP2B1, CYP2C11 and CYP3A1/2 in liver microsomes (●, untreated; ○, phenobarbital; ■, pregnenolone 16 α -carbonitrile; □, 3-methylcholanthrene; ▲, ethanol; △, imidazole) were carried out with anti-CYP2B1, anti-CYP2C11 and anti-CYP3A4 antibodies, respectively.

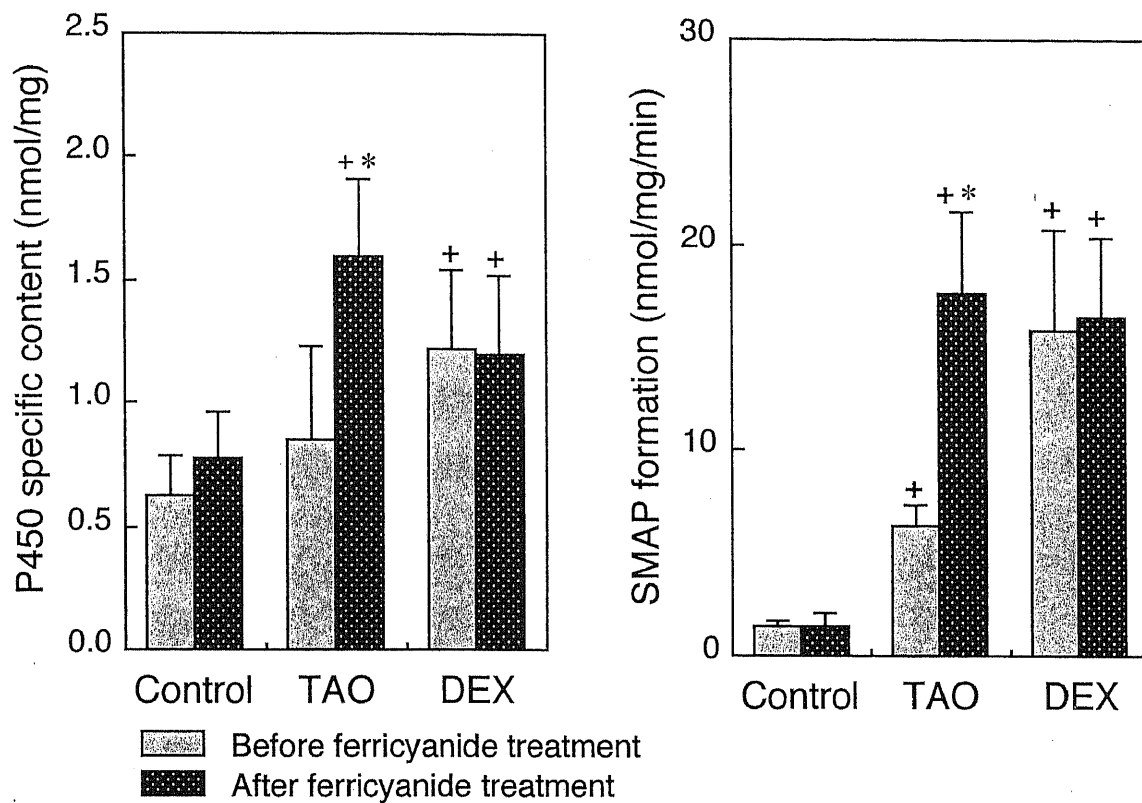


Fig. 9 SMAP-producing activity in liver microsomes from rats treated with triacetyloleandomycin

Liver microsomes were prepared from rats untreated (Control) and rats pretreated with triacetyloleandomycin (TAO) or dexamethasone (DEX), and P450 specific content and SMAP-producing activity were measured before and after the treatment of liver microsomes with ferricyanide. +, $p < 0.05$, compared with the control rats; *, $p < 0.05$; compared with before ferricyanide treatment. Each value represents the mean \pm SD of data of 4 different animals.

Table 3 SMAP formation by purified CYP2B1 and CYP3A2 in a reconstituted system

| Purified rat P450 | SMAP formation (nmol/nmol P450/min) |
|-------------------|--|
| CYP2B1 | 0.07 |
| CYP3A2 | 0.37 |

A reconstituted system contained 100 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM EDTA, the NADPH generating system, 50 pmol of CYP2B1 or 3A2, 1 unit of rat liver microsomal NADPH-P450 reductase, 50 pmol of rat liver microsomal cytochrome b5, 25 μ g of DLPC, zonisamide and the oxygen-consuming system, in a final volume of 1.0 ml.

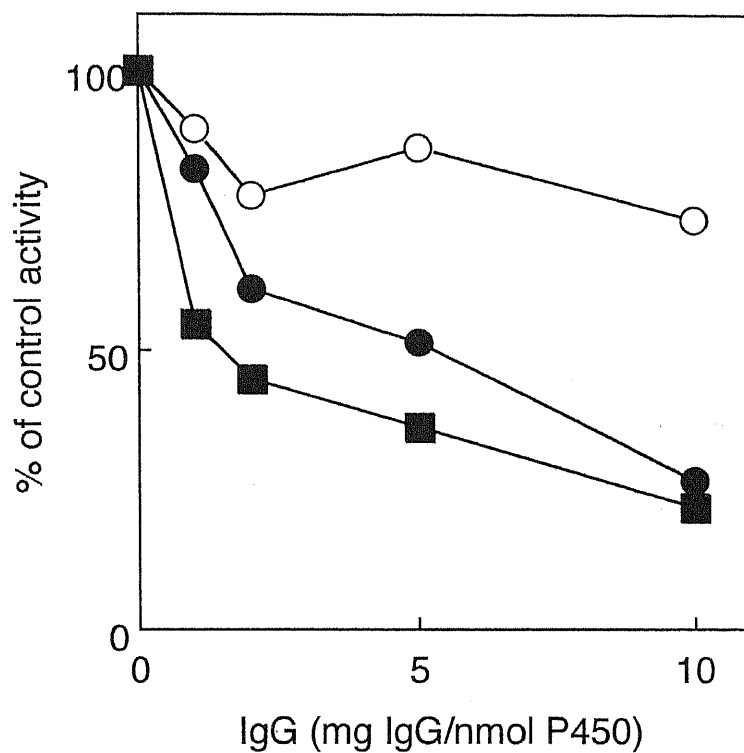


Fig. 10 Effects of antibodies to CYP2B1, CYP3A1/2 and P450 reductase on the SMAP formation from zonisamide in rat liver microsomes
 SMAP-producing activity was measured in the presence of varying amounts of antibodies to CYP2B1 (○), CYP3A1/2 (●) and P450 reductase (■).

第3節 好氣的条件下におけるラット肝ミクロゾームによるゾニサミド代謝

低酸素症の患者における薬物代謝は、正常時と比較し異なることが知られている [41, 42]。また、P450 による薬物代謝は酸素濃度の変化により *in vivo* [43, 44]、*in vitro* [45-47] において代謝活性や代謝経路に影響を受けることが報告されている。ハロタンの代謝は好氣的条件下では酸化的代謝物が生成されるが、低酸素濃度下においては還元的代謝物が生成され、肝毒性を示すことが示されている例は典型例といえる。 [45]。

前節の検討で、ゾニサミドは嫌氣的条件下において、ラット肝ミクロゾーム中の CYP3A1/2 により還元的代謝を受け、SMAP に変換されることを明らかとした。一方、フェノバルビタールやデキサメサゾンで前処理したラット肝ミクロゾームは、好氣的条件下においてもゾニサミド還元活性を有し、その活性は嫌氣的条件下において薬物未処理ラット肝ミクロゾームのそれより有意に高いものであったことから、好氣的条件下におけるゾニサミド代謝は嫌氣的条件下における代謝と質的に異なる可能性が考えられた。そこで、デキサメサゾン、フェノバルビタールおよびトリアセチルオレアンドマイシン前投与ラットより調製した肝ミクロゾームを用い好氣的条件下におけるゾニサミド代謝に関与する酵素について検討を行なった。

【結果・考察】

cofactor 要求性

デキサメサゾン前処理したラット肝ミクロゾームを用いた好氣的条件下におけるゾニサミドの還元的 SMAP 生成への cofactor 要求性を検討したところ、NADH よりも NADPH をよりよい電子供与体とし、NADPH と NADH の相加・相乗効果は認められなかった (Fig. 11)。また、熱処理したミクロゾームでは NADPH の存在においても活性は認められなかった。したがって、ミクロゾーム画分の熱不安定で NADPH を電子供与体とする酵素が、好氣的条件下においてもゾニサミド代謝に関与していることが示唆された。

阻害剤の影響

デキサメサゾンおよびフェノバルビタール前投与したラット肝ミクロゾームを用いたゾニサミド代謝におよぼす種々阻害剤の影響を検討したところ (Fig. 12)、両誘導ミクロゾームにおいて一酸化炭素で顕著な阻害が認められた。また、シメチジン (1mM)

で約60%の阻害が認められた他、検討した他の阻害剤(ケトコナゾール、SKF 525-A、n-オクチルアミン、トリアセチルオレアンドマイシン)においてもシメチジン以上の強い阻害が認められた。したがって、デキサメサゾンおよびフェノバルビタール誘導性のP450 酵素の関与が示唆された。

また、嫌氣的条件下と異なり好氣的条件下では、SKF 525-Aにより SMAP 生成は顕著に阻害されたことから、酸素の存在により、P450還元酵素からのゾニサミド-P450複合体への電子導入による還元に影響が生じた可能性が推察された。

トリアセチルオレアンドマイシンによる誘導効果

さらに、トリアセチルオレアンドマイシン前投与の影響およびマイクロゾームのフェリシアン化カリウム処理の影響について検討した (Fig. 13)。好氣的条件下における SMAP 生成活性は、トリアセチルオレアンドマイシン前投与により有意に上昇した。さらに、マイクロゾームのフェリシアン化カリウム処理の前後において、デキサメサゾン前投与群では変化はなかったが、トリアセチルオレアンドマイシン前投与群で有意に活性が上昇した。トリアセチルオレアンドマイシンは CYP3A の誘導剤であり、かつ代謝物が還元型 CYP3A と複合体を形成し阻害効果を示す代表的薬物である [39, 40]。さらに、この複合体は酸化型 CYP3A においては解離することが知られている。したがって、トリアセチルオレアンドマイシン前投与により有意に活性が上昇したこと、さらにマイクロゾームのフェリシアン化カリウム処理により活性がさらに上昇したことから、好氣的条件下においてもゾニサミドの還元的 SMAP 生成に CYP3A1/2 が関与していることが強く示唆された。しかし、SKF 525-A の SMAP 生成反応におよぼす影響は、嫌氣的条件下と異なり代謝阻害を示したことから、同一酵素が関与しているもののその反応機構は両条件下で異なる可能性も考えられた。

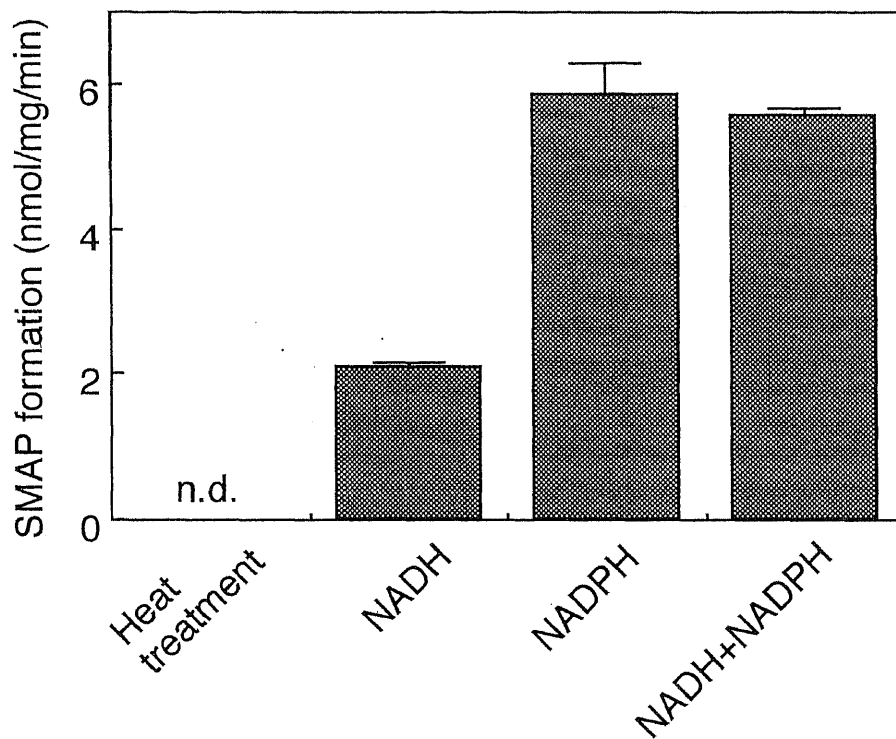


Fig. 11 Effects of heat-treatment and cofactor requirement for SMAP formation under aerobic conditions in liver microsomes of rat pretreated with dexamethasone. Each value represents mean of duplicate determinations. n.d.; Not detected.

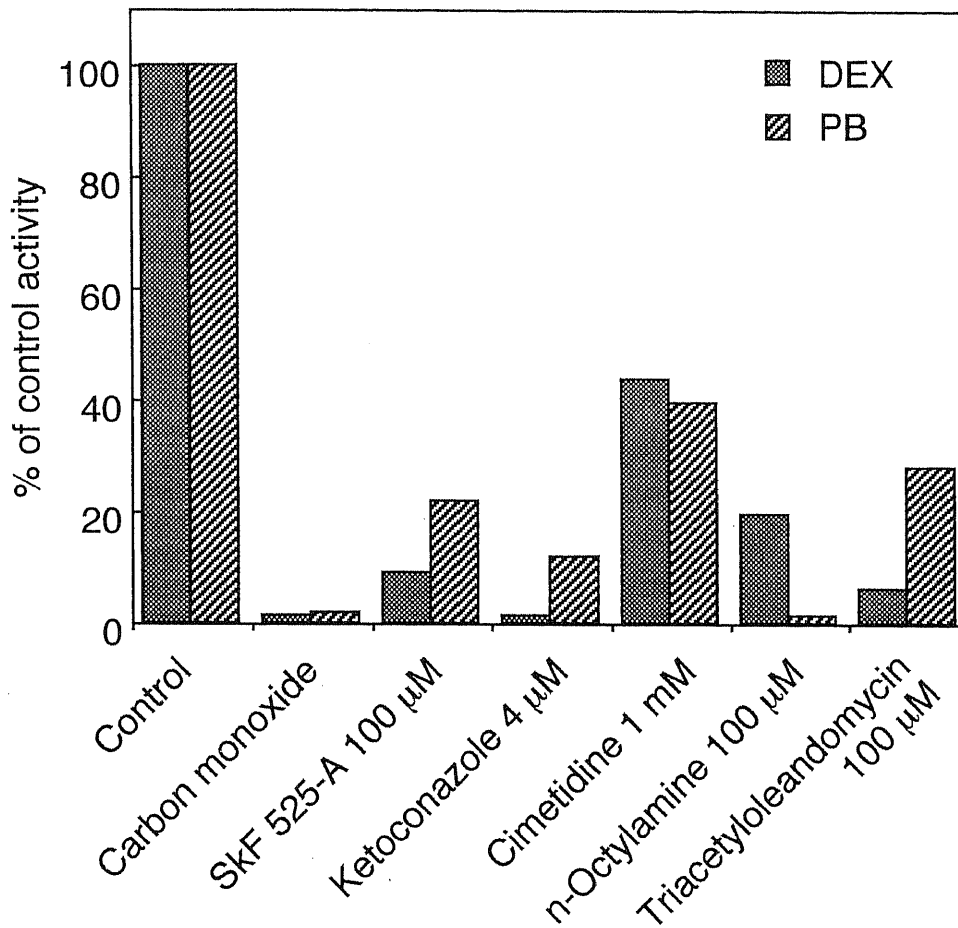


Fig. 12 Effects of various agents on SMAP formation under aerobic conditions in liver microsomes of rat pretreated with dexamethasone or phenobarbital

Each value represents the mean of duplicate determinations. Control values of dexamethasone or phenobarbital pretreated rat liver microsomes are 1.87 and 1.54 nmol/mg/min, respectively.

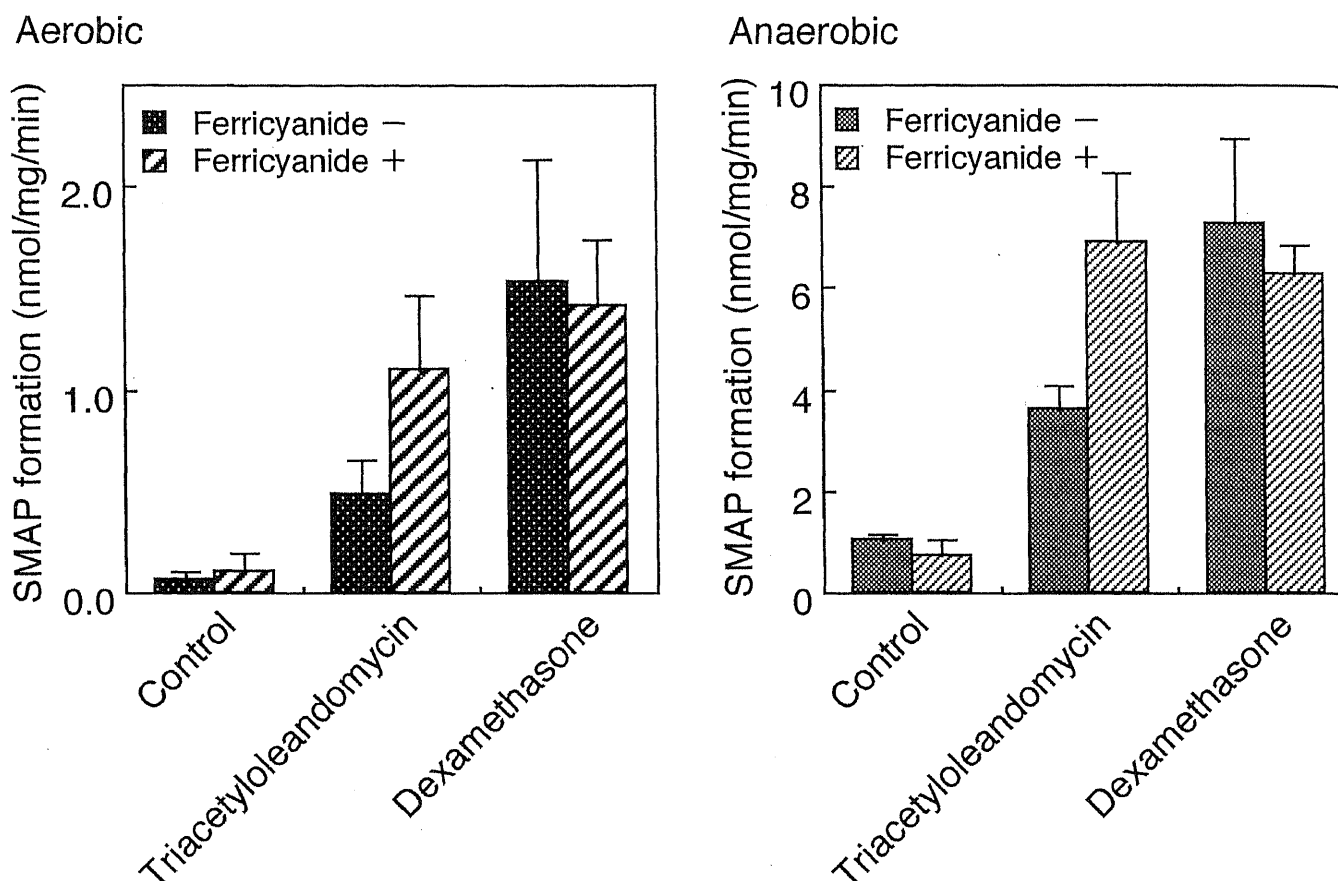


Fig. 13 Effect of ferricyanide treatment on SMAP formation in liver microsomes of rats pretreated with triacetyloleandomycin and dexamethasone

Liver microsomes were prepared from rats untreated (Control) and rats pretreated with triacetyloleandomycin or dexamethasone, and P450 specific content and SMAP-producing activity were measured before (Ferricyanide -) and after (Ferricyanide +) the treatment of liver microsomes with ferricyanide. +, $p < 0.05$, compared with the control rats; *, $p < 0.05$; compared with before ferricyanide treatment. Each value represents the mean \pm SD of data of 4 different animals.

第4節 反応速度論的解析

前節までの検討で、ゾニサミドはラット肝ミクロゾームの CYP3A1/2 により嫌氣的条件下において SMAP に代謝されること、また嫌氣的条件下に比較し活性は低いものの好氣的条件下においても CYP3A1/2 により SMAP に代謝されることが明らかとなった。本節においては、両条件下におけるゾニサミドの還元的 SMAP 生成の速度論的解析をデキサメサゾン前投与ラット肝ミクロゾームを用いて行なった。

【結果・考察】

Lineweaver-Burk プロット解析の結果、好氣的条件下および嫌氣的条件下のどちらにおいても検討した基質濃度（1～400 μM ）において直線で回帰された（Fig. 14）。得られた反応速度論パラメータを Table 4 に示した。嫌氣的条件下の V_{max} は好氣的条件下のそれより約3倍大きく、 K_m は好氣的および嫌氣的の両条件下においてほぼ同じ値であった。したがって、ゾニサミドの還元的 SMAP 生成反応に対して酸素は非拮抗阻害的に作用することが明らかとなった。

嫌氣的条件下および好氣的条件下での結果より、ゾニサミドと P450 の反応機作を以下のように推察した。

1) 酸素の存在により SMAP 生成反応は非拮抗阻害様式を示したことから、また、Stiffら [29] のラット肝ミクロゾームを用いたゾニサミドの基質結合差スペクトルの結果が、スペクトル変化は Type I を示すことから、スルホンアミド基を構造に有するゾニサミドであるが、P450 酵素への結合部位はヘム鉄ではなく P450 タンパク側であると考えられた。

2) 嫌氣的条件下において SMAP 生成活性は SKF 525-A により顕著に亢進したことから、ゾニサミド-P450 複合体への fp2 からの電子導入によりヘム鉄が還元され、引き続きゾニサミドが還元され、酵素複合体が解離するいわゆる一電子還元反応と考えられた。

3) SKF 525-A によるゾニサミド-P450 複合体への fp2 からの電子導入によるヘム鉄の還元促進は、酸素により影響を受けると考えられた。

一方、小西ら [48] は、ゾニサミド基質差スペクトルをマウス肝ミクロゾームを用いて行ったところ、Type II を示したと報告している。ゾニサミドはスルホンアミド基を有することから、Type II 変化を示すことも十分考えられる。ゾニサミド-P450 の反応機作には種差がある可能性もあると予想された。

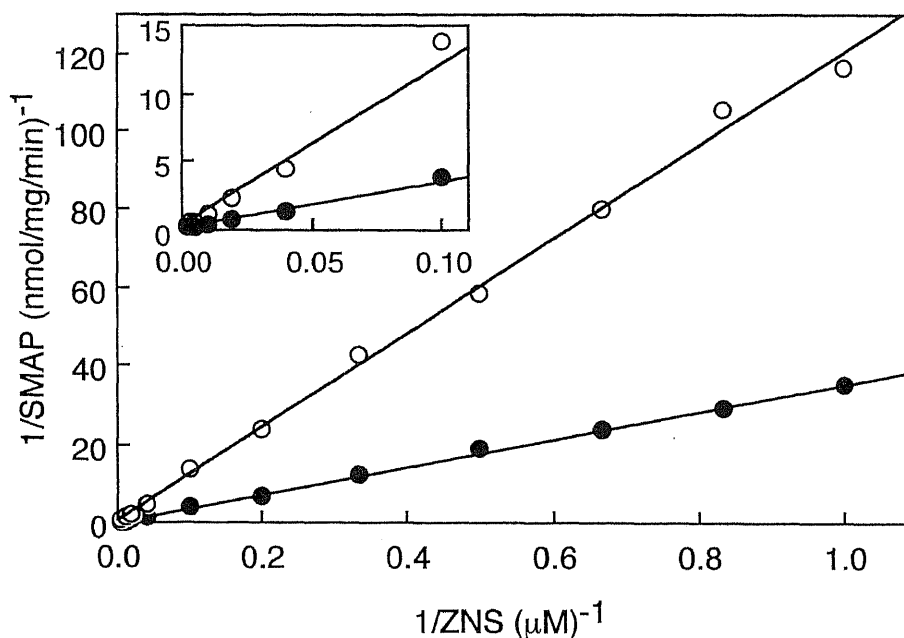


Fig. 14 Lineweaver-Burk plots for SMAP formation under aerobic and anaerobic conditions in liver microsomes of rat pretreated with dexamethasone. The reaction was carried out under anaerobic (●) and aerobic (○) conditions. Each value represents the mean of duplicate determinations.

Table 4 Kinetic parameters for SMAP formation from zonisamide under aerobic and anaerobic conditions in liver microsomes of rats pretreated with dexamethasone

| | Km (μM) | Vmax (nmol/mg/min) |
|-----------|-------------------------|-----------------------|
| Anaerobic | 275 | 7.73 |
| Aerobic | 287 | 2.39 |

第5節 小 括

ラット肝の *in vitro* におけるゾニサミド代謝の検討から以下の知見を得た。

1) ゾニサミドを基質とした *in vitro* の反応系で生成する主代謝物である SMAP の HPLC での定量を可能とした。

2) ゾニサミドはラット肝ミクロゾーム画分の NADPH を電子供与体とする酵素により嫌気的および好气的条件下において還元的に SMAP に代謝されること、さらに、この代謝には CYP3A1/2 が関与していることを明らかとした。

3) ゾニサミドの還元的 SMAP 生成反応に対し、酸素は非拮抗阻害を示すことが明らかとなった。

3) ゾニサミドの還元的代謝は、b5 由来の第 2 電子を必要とせず、第 1 電子で還元されていると考えられた。

実験の部

動物

Sprague Dawley (SD) 系雄性ラットは高杉実験動物（埼玉）より購入し、1週間の予備飼育の後8週齢（250-350 g）のものを用いた。誘導剤前処理のラットには、フェノバルビタール（80 mg/kg, ip）5日間、プレグネロン 16 α -カーボニトリル（50 mg/kg, ip）5日間、イミダゾール（200 mg/kg, ip）4日間、エタノール（10%）5日間、3-メチルコランスレン（25 mg/kg, ip）1日おきに3日、トリアセチルオレアンドマイシン（400 mg/kg, ip）3日間、デキサメサゾン（50 mg/kg, ip）3日間、それぞれ投与した。18~20時間絶食した後、放血致死させ肝臓を摘出した。

試薬

ゾニサミドおよび2-スルファモイルアセチルフェノール（SMAP）は、大日本製薬（株）より供与されたものを用いた。NADPH、NADH、NADP⁺、グルコース6リン酸、グルコース6リン酸脱水素酵素はオリエンタル酵母（株）より購入した。ブロムワレリル尿素は、局方品を再結晶して用いた。

その他の試薬は、HPLC用または特級以上の物を用いた。

肝ミクロゾームおよびサイトゾールの調製

肝ミクロゾームおよびサイトゾールは Kitada らの方法 [49] により調製した。即ち、放血致死させた動物より摘出した肝を、1.15%の KCl 溶液にて還流し血液を十分除去した後、肝重量の3倍容の氷冷 1.15% KCl 溶液を加えホモジナイズし、冷却遠心機にて 9,000 \times g で 20 分間遠心分離した。得られた上清をさらに 105,000 \times g で 60 分間超遠心し、その上清をサイトゾールとした。その時の沈殿を再度 1.15% KCl 溶液を加えホモジナイズした後、105,000 \times g で 30 分間超遠心し、得られた沈殿を 0.1 mM EDTA を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）に懸濁し肝ミクロゾームとした。

タンパク定量

タンパク定量は Lowry ら [50] の方法に従い、牛血清アルブミンを標準タンパクとして行い、測定は HITACHI 100-20 型分光光度計により行った。

Cytochrome P450 含量の測定

Omura と Sato [51] の方法に従い、還元型の一酸化炭素結合差スペクトルから求めた。測定は HITACHI 228-A 型ダブルビーム分光光度計により行った。

肝ミクロゾームおよびサイトゾールでの代謝物の定量

基本的な反応溶液（全量 1 mL）の組成は、100 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）、0.1 mM EDTA、0.4 mM ゴニサミド、ミクロゾームまたはサイトゾール（1 mg 蛋白）および NADPH-生成系（0.33 mM NADP⁺、8 mM グルコース 6-リン酸、0.1 U グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ、6 mM 塩化マグネシウム）からなり、ツンベルグ管中に作成した。ただし、NADPH 生成系はツンベルグ管のアーム部に入れ密栓した。必要に応じてツンベルグ管内を、バキュームフラッシュ法によりアルゴンガスで置換した。37℃で5分間プレインキュベートした NADPH-生成系の添加により反応を開始した。20分の反応の後、反応液 0.5 mL をジクロロメタン 4 mL の入ったキャップ付き試験管にとることにより反応を停止させた。内部標準物質として 0.4 mg/mL ブロムワレリル尿素メタノール溶液 160 μ L を添加した後、10分間振盪しジクロロメタンに抽出した。1,600 \times g で10分間遠心分離した後、有機層を分取し、ロータリーエバポレーターで有機層を減圧留去後、残渣をメタノール 100 μ L に溶解し HPLC にインジェクトした。

HPLC による SMAP の定量条件

ポンプ； dual-delivery pump (Waters Model 6000A)

検出器； Soma Model S-310A

レコーダー； National VP-6610A

カラム； Inertsil ODS-2 column (particle size 5 μ m, 4.6 x 250 mm, GL Science)

カラム温度； 35 $^{\circ}$ C

移動相； 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 pH 4.0：アセトニトリル：2-プロパノール (120：40：8, v/v)

流速； 0.8 mL/min

検出波長； 260 nm

内部標準物質； ブロムワレリル尿素

イムノブロット分析

Laemmli [52] の方法により SDS-PAGE を行った後、Guengerich ら [53] の方法

に従い、ニトロセルロース膜に転写した後、Peroxidase antiperoxidase 法により染色をし、得られたバンドの染色強度を各精製 P450 標品の染色強度を検量線として 2 波長クロマトスキャナーを用いて、400 nm の吸収を測定することにより算出した。

マイクロゾームのフェリシアン化カリウム処理

マイクロゾーム (3mg/mL) を 50 μ M フェリシアン化カリウムと 25 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした後、105,000 \times g で 30 分間超遠心した。得られたペレットを 1.15% KCl に懸濁し 105,000 \times g で 30 分間超遠心した。この操作を 2 回繰り返した後、0.1mM EDTA を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に約 20 mg/mL のタンパク濃度で懸濁した。

再構成系による代謝

DLPC 25 mg に精製 P450 50 pmol、ラット肝より精製した fp2 1 unit、ラット肝より精製した b5 50 pmol をツンベルグ管にとり、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、0.1 mM EDTA、0.4 mM ゴニサミド、および酸素消費系 (10mM グルコース、5 unit グルコースオキシダーゼ、30 unit カタラーゼ) を加え、バキュームフラッシュ法によりアルゴンガスで置換した [54]。37 $^{\circ}$ C で 3 分のプレインキュベーションの後、37 $^{\circ}$ C で 5 分間プレインキュベートした NADPH-生成系 (0.33 mM NADP⁺、8 mM グルコース 6-リン酸、0.1 U グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ、6 mM 塩化マグネシウム) の添加により反応を開始した。以降は、マイクロゾームを酵素源にしたときと同様に行った。

抗体添加による代謝

抗 P450 抗体または抗 fp2 抗体と preimmuno IgG を、反応溶液中の総 IgG 量が一定 (10 mg IgG/nmol P450) となるようにツンベルグ管にとり、マイクロゾーム (0.2 mg/mL) と抗体とを 37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした後、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、0.1 mM EDTA、0.4 mM ゴニサミド、および酸素消費系 (10mM グルコース、5 unit グルコースオキシダーゼ、30 unit カタラーゼ) を加え、バキュームフラッシュ法によりアルゴンガスで置換した。37 $^{\circ}$ C で 3 分のプレインキュベーションの後、37 $^{\circ}$ C で 5 分間プレインキュベートした NADPH-生成系 (0.33 mM NADP⁺、8 mM グルコース 6-リン酸、0.1 U グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ、6 mM 塩化マグネシウム) の添加により反応を開始した。以降は、マイクロゾームを酵素源にした

ときと同様に行った。

精製酵素および抗体

CYP2B1 はフェノバルビタール前処理雄性ラット肝より、Ryan ら [55] の方法により精製したものをを用いた。CYP2C11 は薬物未処理雄性ラット肝より、Kamataki ら [56] の方法により精製したものをを用いた。CYP3A4 はヒト肝より、Komori ら [57] の方法により精製したものをを用いた。fp2 はフェノバルビタール前処理雄性ラット肝より、Yasukochi と Masters [58] の方法を若干変更した、Kitada ら [59] の方法により精製したものをを用いた。b5 はラット肝より、Ohmori ら [60] の方法により精製したものをを用いた。抗体は精製酵素を抗原とし、雄性日本白色ウサギに精製酵素を感作し、Kamataki ら [61] の方法を改変して、Kitada ら [62] の方法により作成した。

第2章 ゾニサミド代謝に関与するヒト肝 P450 分子種

薬物代謝には動物種により差があることが知られている。つまり代謝能の量的・質的な違いである。一般に、実験動物として汎用されている小動物（マウス、ラット、モルモットなど）で得られた実験結果を、ヒトに外挿する際に、満足な結果が得られない理由の一つである。そこで、ヒトにおける薬物動態および薬物間相互作用を考える上で、薬物のヒトにおける代謝の特徴・関与する酵素を明らかにすることが重要である。

ゾニサミドのヒトにおける体内動態の特徴として血中濃度の非線形性が上げられる。ゾニサミドの非線形体内動態は、Wagnerら [63] および西口ら [64] により、それぞれ10人および8人の患者において1人の患者から2つの異なる投与量により得られた定常状態の血中濃度から検討され報告されている。前者は投与量が 400 mg/day ~ 1,200 mg/day と高用量であること、後者は小児患者を含む8人（1歳~26歳、平均 13.4歳）において 3.3 mg/kg/day ~ 13.0 mg/kg/day の範囲で、さらに 11 歳未満と 11 歳以上の2群において検討されていることが特徴である。一方、小野ら [14] により、ゾニサミドの線形体内動態も報告されているが、臨床第3相における 456 例の血中濃度データの全体解析からであり、多施設による検討でもあることから、種々条件の誤差の存在も否定できないことを考慮しなければならない。

非線形体内動態を示す代表的な薬物であるフェニトインでは、代謝過程の飽和がその機序とされている [65]。ゾニサミドのヒトにおける代謝について詳細に検討することは、非線形体内動態をとるゾニサミドの臨床における体内動態を把握する上で有意義なことと考えられる。

本章においては、ゾニサミド代謝に関与するヒトにおける酵素について、ヒト肝ミクロゾームとワクシニアウイルス-Hep G2 発現系による発現ヒト P450 を用いて検討した。

第1節 ヒト肝マイクロゾームによるゾニサミド代謝

前章の結果より、ゾニサミドの還元的代謝には CYP3A サブファミリーに属する酵素が関与することが明らかとなった。本節においては、ヒト肝マイクロゾームを酵素源とし SMAP 生成活性に及ぼす cofactor、酸素濃度、阻害剤の影響を検討した。また、SMAP 生成活性と総 P450 量や P450 分子種量との相関性、および種々の薬物代謝活性との相関性を検討した。さらに、ヒト肝より CYP3A4 を精製し、CYP3A4 の SMAP 生成活性の有無を検討した。また、各種抗 P450 抗体の影響を検討した。

【結果・考察】

cofactor 要求性

ヒト肝マイクロゾームを用い、嫌氣的条件下において電子供与体として NADPH または NADP の 1 mM 存在下およびそれぞれ 1 mM 共存下において SMAP 生成活性を測定したところ、NADH を用いた場合より NADPH を用いた場合が約 4 倍高い活性を示した (Fig. 15)。また、NADPH と NADP 共存下においても SMAP 生成活性は、NADPH 1 mM のみの場合とほぼ同等の活性を示した。また、熱処理したマイクロゾームには活性が認められなかった (データ未提示)。

ラット肝マイクロゾームを用いた場合と同様に、ゾニサミドを基質とした場合、NADPH を電子供与体としたときに高い活性が得られ、さらに相乗的に増加する現象 (NADH synergism) は認められなかったことから、ゾニサミドの還元的 SMAP 生成反応は、ヒト肝マイクロゾーム中の NADPH を電子供与体とする熱不安定な酵素により触媒されていることが明らかになった。

酸素濃度の影響

ヒト肝マイクロゾームにおけるゾニサミドの還元的 SMAP 生成活性は、好氣的条件下 (大気中の酸素濃度: 20.96%) では活性が認められず、検討した低酸素濃度域 (1% 以下) において活性が認められた。また、酸素消費系 (グルコース、グルコースオキシダーゼ、カタラーゼ) を添加した完全嫌氣系において最大活性を示した (Fig. 16)。ヒト肝マイクロゾームにおいてもゾニサミドの還元的 SMAP 生成は、好氣的条件下より嫌氣的条件下で進行することが明らかとなった。

Takahara ら [46] は、気相中の酸素濃度を変化させたときの反応液中の酸素濃度を実測しており、その結果を検量線とすると、生体内の肝小胞体周囲の酸素濃度といわれている濃度域 (5 ~ 10 μ M) は、気相中の酸素濃度 0.01% 以下に相当する。SMAP 生成活性は、0.01% 以下の気相中酸素濃度において、酸素消費系を添加したときと大きな活性の差は認められないことから、ヒト肝マイクロゾームにおけるゾニサミド代謝については、酸素消費系を添加した完全嫌気条件下において行なっても問題はないと考えられた。

阻害剤の影響

ゾニサミドの SMAP 生成活性におよぼす各種阻害剤の影響を検討した (Fig. 17)。SMAP 生成活性は、シメチジン (1mM) で約40%阻害され、さらに、一酸化炭素、ケトコナゾール (40 μ M)、n-オクチルアミン (250 μ M) により、ほぼ完全に阻害された。これらは P450 に対する代表的な阻害剤であることから、ゾニサミドの還元的 SMAP 生成に P450 が関与することが推察された。一方、P450 の代表的阻害剤として知られている、SKF 525-A においては、濃度依存的な活性の上昇が認められた。

SMAP 生成の個体差と P450 量

21 例のヒト肝マイクロゾームを用いてゾニサミドの SMAP 生成活性を測定したところ、5 例で検出限界以下であり、活性の認められた 16 例においても 0.01 nmol/mg/min から 1.05 nmol/mg/min まで顕著な活性の個体差を認めた (Fig. 18)。また、これら 21 例のヒト肝マイクロゾームの P450 比含量と SMAP 生成活性の間には有意な正の相関は認められなかった (Fig. 19)。したがって、複数の分子種の存在が知られている P450 において、各分子種間でゾニサミドの還元的 SMAP 生成活性に違いがあることが推察された。

SMAP 生成活性と他の代謝活性との相関性

21 例のヒト肝マイクロゾームを用い、ゾニサミドの還元的 SMAP 生成活性とアニリン水酸化活性、ベンツフェタミン N-脱メチル化活性、イミプラミン 2-水酸化活性、テストステロン 6 β -水酸化活性と SMAP 生成活性の相関性を検討した結果を Fig. 20 に示した。ゾニサミドの還元的 SMAP 生成活性は、テストステロン 6 β -水酸化活性と最も高い正の相関 ($r^2=0.96$) を示し、それ以外の活性とは、有意な相関は認められなかった。

アニリン水酸化は CYP2E1 [66] により、ベンツフェタミン N-脱メチル化は CYP2B [67]、CYP2C [68]、CYP3A [69] により、イミプラミン 2-水酸化は CYP2D6 [70] により、テストステロン 6 β -水酸化活性は CYP3A4 [71] により代謝されることが報告されていることから、ゾニサミドの還元的 SMAP 生成には、最も相関の高かったテストステロン 6 β -水酸化に關与する CYP3A4 により代謝されることが推察された。

SMAP 生成活性と P450 分子種含量との相関性

21 例のヒト肝マイクロゾームを用い、ゾニサミドの還元的 SMAP 生成活性とイムノブロット法により求めた P450 分子種含量との相関性を検討した結果を Fig. 21 に示した。抗 CYP2C9 抗体を用いて定量した CYP2C と SMAP 生成活性との間には相関は認められなかった。一方、抗 CYP2D1 抗体を用いて定量した CYP2D6 および抗 CYP3A4 抗体を用いて定量した CYP3A との間には正の相関が認められたが、相関性は CYP2D6、CYP3A において r^2 でそれぞれ 0.31、0.77 であり、CYP3A の方が顕著に高かった。前項での結果である CYP2D6 のプローブ活性であるイミプラミン 2-水酸化活性とゾニサミドの還元的 SMAP 生成活性の間に高い相関性が認められなかったこと、および、CYP3A 含量と CYP2D6 含量が正の相関 ($r^2=0.45$) を示したこと (データ未提示) から、Fig. 21 での CYP2D6 含量とゾニサミドの還元的 SMAP 生成活性の間の弱い相関性はヒト肝マイクロゾーム中の CYP3A と CYP2D6 の発現量の相関による結果と考えられ、本結果からもゾニサミドの還元的 SMAP 生成には、CYP3A が代謝に關与することが推察された。

精製 P450 による代謝活性

ヒト肝マイクロゾームより精製した CYP3A4 を用い、精製酵素におけるゾニサミドの還元的 SMAP 生成活性を検討した (Table 5)。脂質として DLPC を使用し、ラット肝より精製した fp2 および b5 を必要に応じ添加した。DLPC と fp2 の系では、SMAP 生成活性は認められなかったが、さらに精製 CYP3A4 を添加した系および精製 CYP3A4 と b5 を添加した系を嫌氣的条件下で反応させた場合に SMAP 生成活性が認められた。このことより、CYP3A4 は嫌氣的条件下においてゾニサミドを SMAP に代謝することが明らかとなった。また、b5 は P450 の酸化・還元サイクルの中で、第 2 電子の導入に關与しており、一般に CYP3A に対しては第 2 電子の導入が律速となる [72] ことから、b5 の添加により CYP3A4 の關与する活性が上昇することが報告されている [73、

74]。b5 の添加により SMAP 生成活性の上昇は認められなかったことから、ゾニサミドから SMAP へは、b5 由来の第 2 電子を必要としない 1 電子で還元されているものと推察された。

抗体の影響

ヒト肝ミクロゾームにおけるゾニサミドの還元的 SMAP 生成反応に対する抗 P450 抗体の影響を検討した (Fig. 22)。異なる 2 検体とも、抗 CYP2C9 抗体および抗 CYP2D1 抗体により SMAP 生成活性は阻害されなかったが、抗 CYP3A4 抗体により濃度依存的に活性が阻害され、P450 当たり 10mg IgG の抗体の添加で 90% 以上の阻害が認められた。このことから、ヒト肝ミクロゾームにおけるゾニサミドの還元的 SMAP 生成反応に、CYP3A が主に関与していることが示唆された。

反応速度論的解析

ヒト肝ミクロゾームによるゾニサミドの還元的 SMAP 生成反応の速度論的解析を行なった (Fig. 23)。Lineweaver-Burk プロットにより、検討した基質濃度範囲 ($10\ \mu\text{M}$ ~ $400\ \mu\text{M}$) では明らかな直線が得られ、 K_m は $211\ \mu\text{M}$ 、 V_{max} は $0.314\ \text{nmol/mg/min}$ であった。ヒト肝ミクロゾームによるシクロスポリン代謝の K_m は $3\sim 10\ \mu\text{M}$ [75]、ミタゾラム代謝の K_m は $4\sim 18\ \mu\text{M}$ [76] と報告されており、これらと比較すると、ゾニサミドの代謝の K_m は顕著に大きく、親和性は比較的小さいものと考えられる。それゆえ、CYP3A により代謝される薬物との併用により代謝阻害を容易に受けやすいものと推察された。

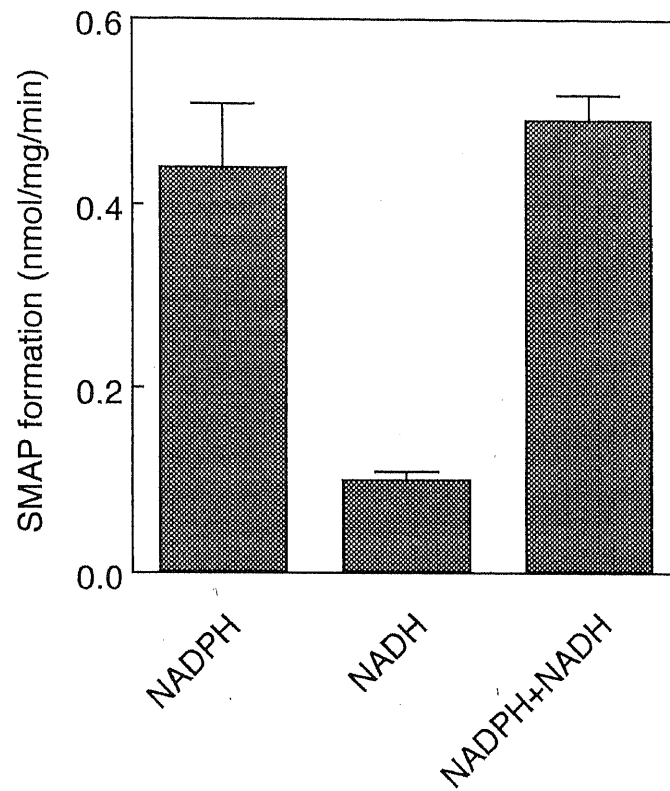


Fig. 15 Cofactor requirement for SMAP formation in human liver microsomes
Assays were carried out in the presence of NADPH (1 mM) and/or NADH (1 mM).
Each value represents the mean \pm SD of duplicate determinations.

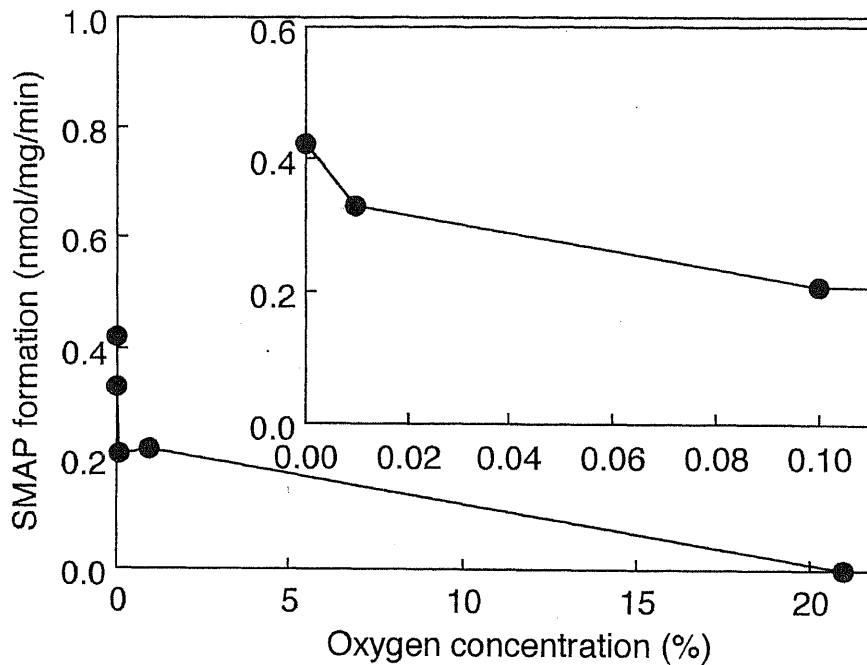


Fig. 16 Effect of oxygen concentration on SMAP formation in human liver microsomes
 Assays were carried out in the Thunburg cuvettes after the gas phase was exchanged with oxygen and nitrogen gas prepared for various oxygen concentration. Each value represents the mean \pm SD of triplicate determinations.

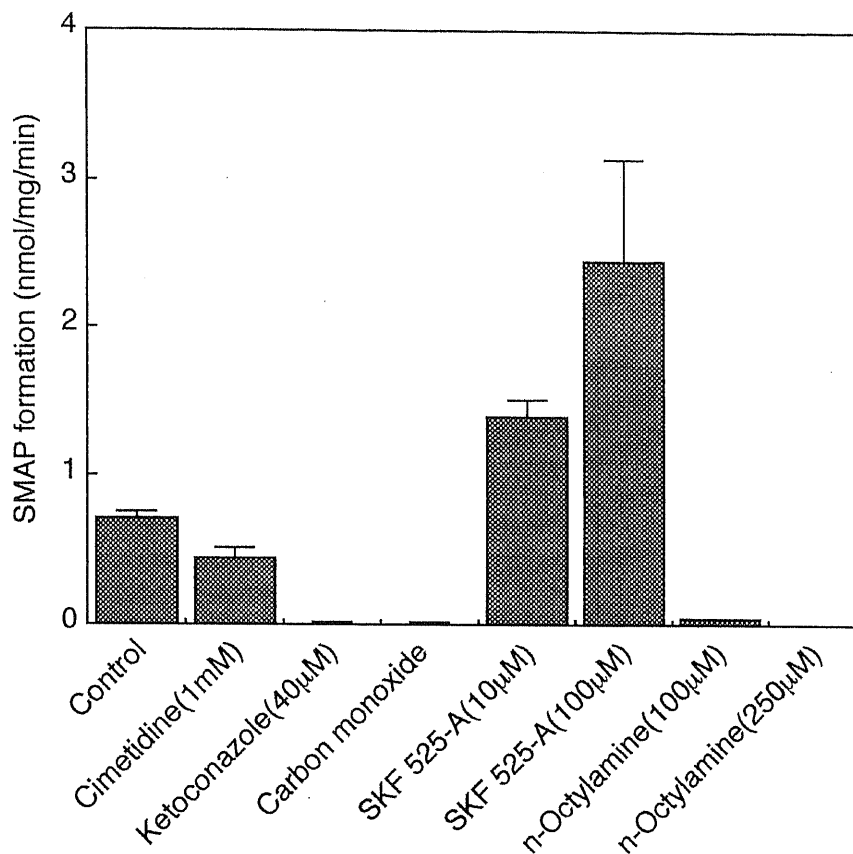


Fig. 17 Effects of various agents on the formation of SMAP from zonisamide in human liver microsomes

The formation of SMAP from zonisamide was measured in the presence or absence of cimetidine, ketoconazole, SKF 525-A and n-octylamine, under anaerobic conditions. When the effect of carbon monoxide on the reaction was studied, carbon monoxide was used in place of argon as the gas phase in the Thunburg cuvettes. Each value represents mean \pm SD of duplicate determinations.

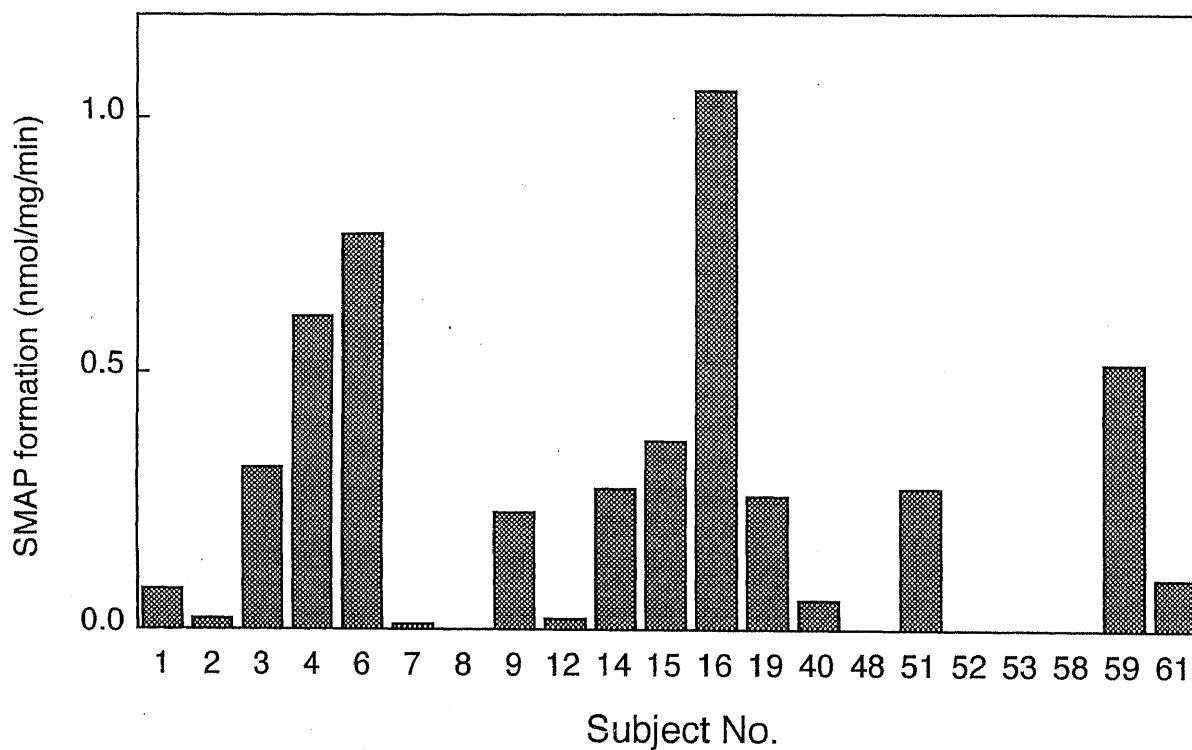


Fig. 18 Reductive metabolism of zonisamide to SMAP in human liver microsomes
 Twenty-one different microsomal samples of human livers which were autopsy samples obtained within 20 hr after death were used in this experiment. Each value represents mean of duplicate determinations.

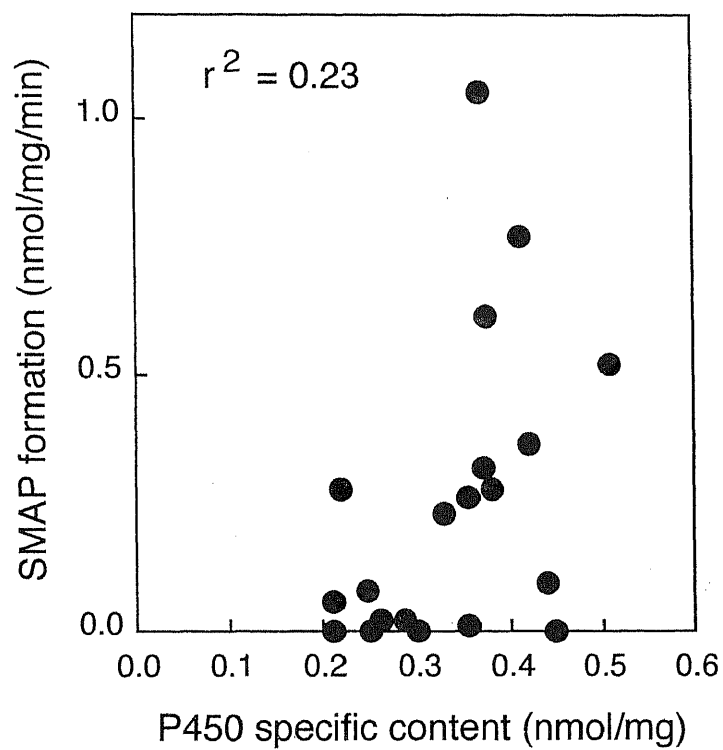


Fig. 19 Correlation of SMAP formation and spectrally determined P450 content
SMAP-producing activity and P450 content were measured with different human liver samples.

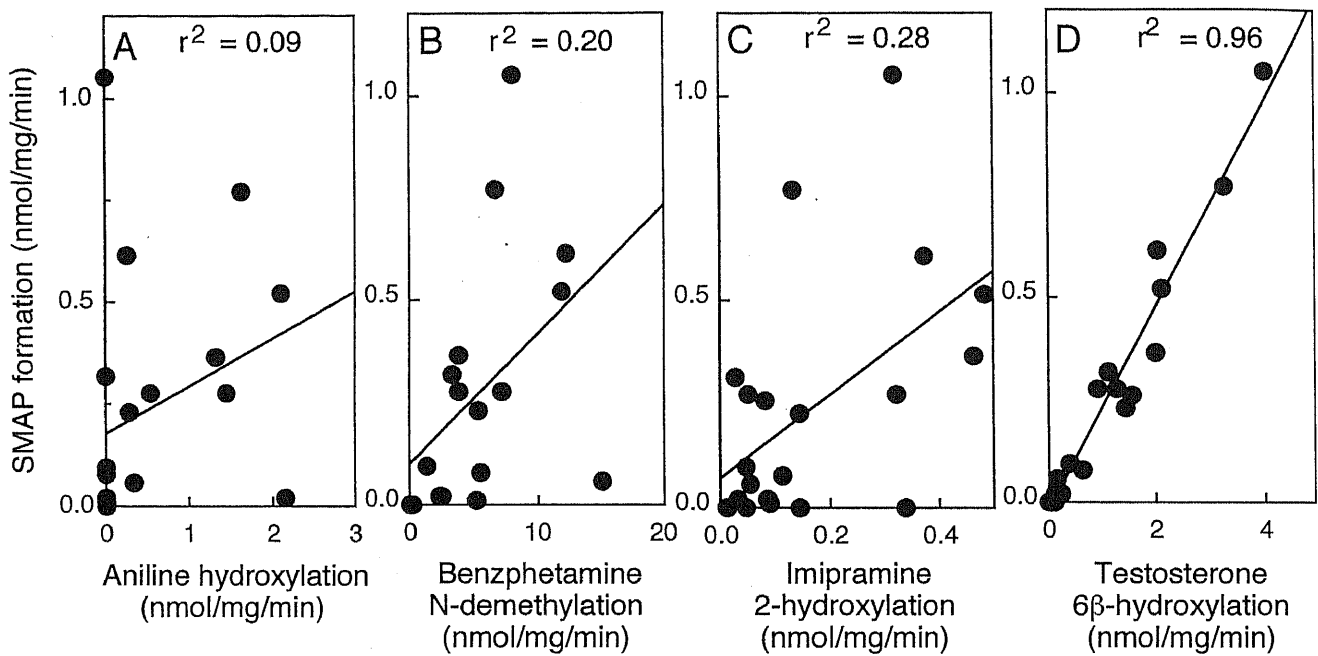


Fig. 20 Correlation of SMAP formation with aniline hydroxylation (A), benzphetamine *N*-demethylation (B), imipramine 2-hydroxylation (C) and testosterone 6 β -hydroxylation (D) in different human liver microsomal samples.

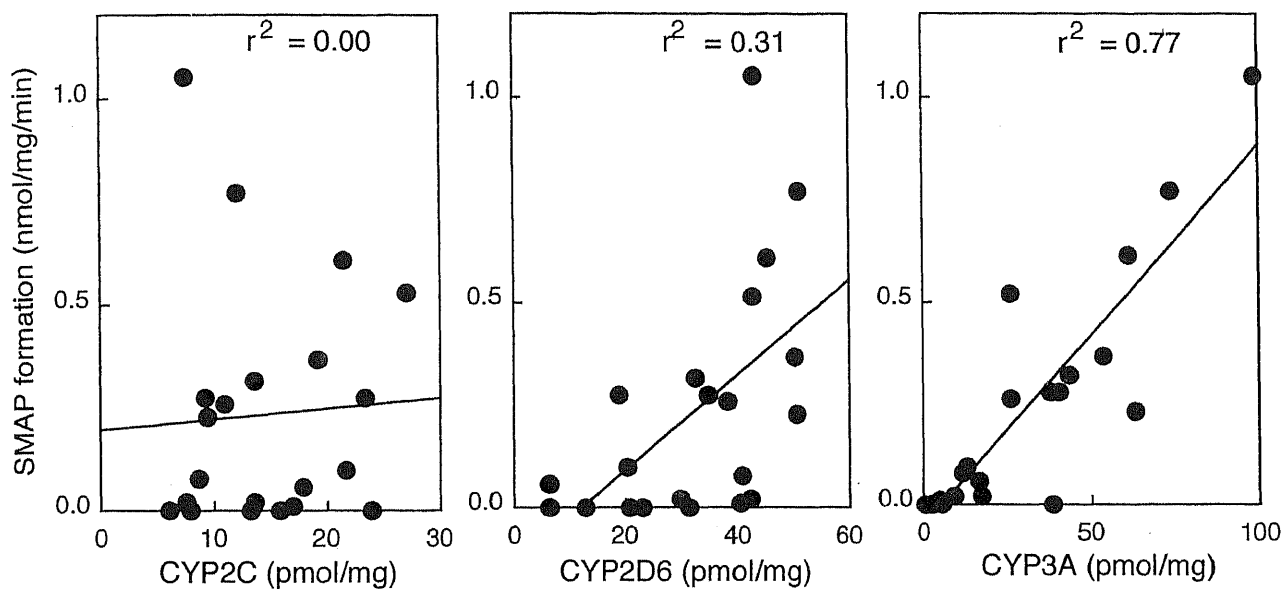


Fig. 21 Correlation of SMAP formation with the amounts of CYP2C, CYP2D6 and CYP3A in different human liver microsomes

The amounts of CYP2C, CYP2D6 and CYP3A were immunochemically quantitated with anti-CYP2C9, anti-CYP2D1 and anti-CYP3A4 antibodies, respectively.

Table 5 SMAP formation by purified CYP3A4 in a reconstituted system

| | SMAP formation (nmol/nmol P450/min) | |
|---------------------------|--|-----------|
| | Aerobic | Anaerobic |
| DLPC + P450 reductase (A) | < 0.02 | < 0.02 |
| (A) + P450 | < 0.02 | 0.47 |
| (A) + P450 + b5 | < 0.02 | 0.42 |

A reconstituted system contained 100 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM EDTA, the NADPH-generating system, 20 pmol of CYP3A4, 1 unit of rat liver microsomal NADPH-P450 reductase, 25 µg of DLPC and zonisamide, in a final volume of 1.0 ml. Cytochrome b5 (20 pmol) purified from rat livers was added to the system if necessary. In the case of anaerobic conditions the reaction was carried out in the presence of the oxygen-consuming system.

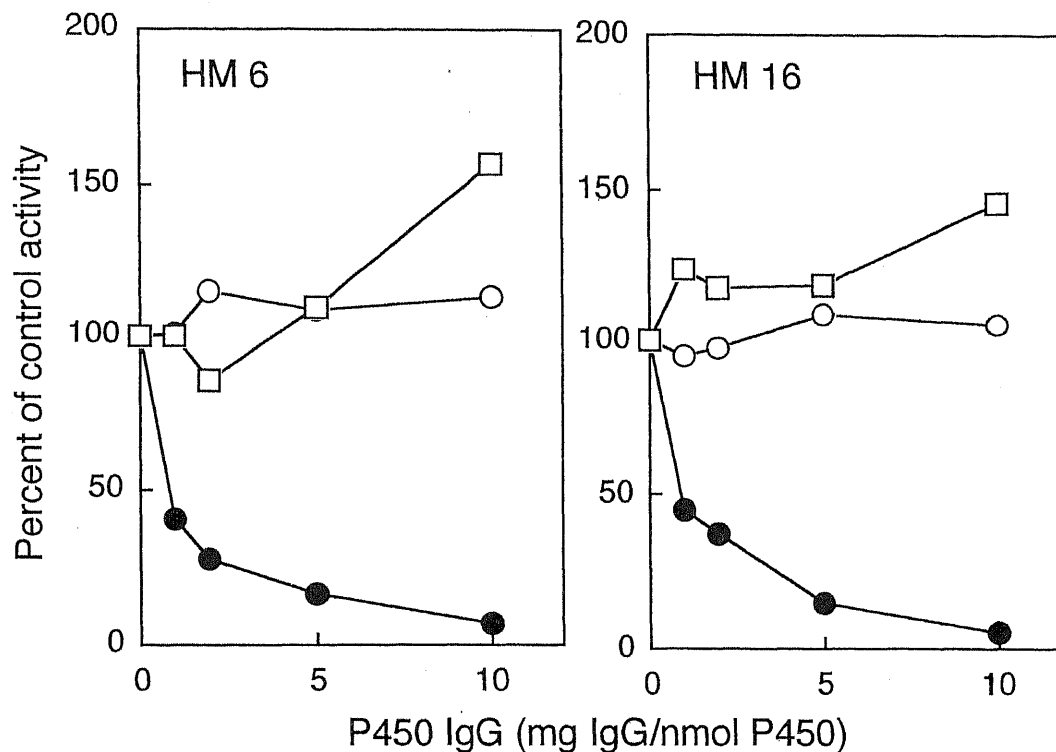


Fig. 22 Effects of anti-P450 antibodies on the formation of SMAP from zonisamide in human liver microsomes

SMAP formation was measured in the presence of anti-CYP2C9 antibody (○), anti-CYP2D1 antibody (□) or anti-CYP3A4 antibody (●). The concentrations of antibodies added to the reaction mixture are specified in the figure. SMAP-producing activities of HM6 and HM16 in the absence of antibodies were 0.36 ± 0.11 and 0.55 ± 0.12 nmol of product/mg/min, respectively.

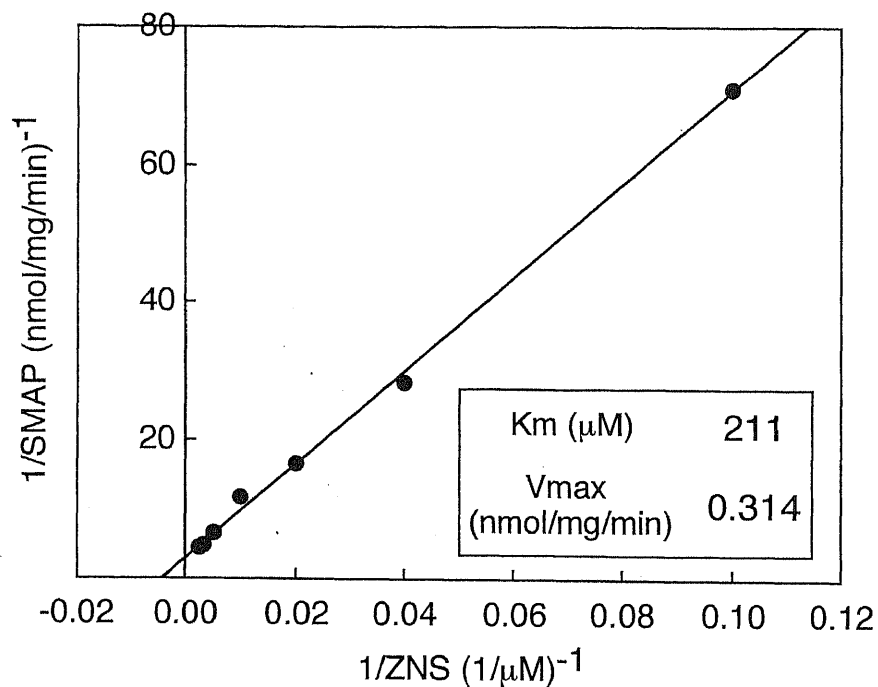


Fig. 23 Lineweaver-Burk plots and kinetic parameters for SMAP formation under anaerobic conditions in human liver microsomes
 Each value represents the mean of duplicate determinations.

第2節 発現ヒト P450 によるゾニサミド代謝

ヒト肝ミクロゾームおよび精製酵素を用いた前節の結果から、CYP3A4 がゾニサミドの還元的 SMAP 生成活性を有し、主に関与していることが明らかとなった。しかし、この結果から他の P450 酵素が活性を示さないと断定することは無理である。ゾニサミドは多剤併用の可能性が高いこと、および体内動態が非線形性を示すこと [63、64] などから、代謝に関与する酵素を詳細に解明することは、薬物相互作用を回避する上で重要であると考えられる。そこで、近年発達してきた分子生物学的手法を用い Hep G2 細胞に発現させた 10 種のヒト P450 [77] を用い、ゾニサミド代謝に関与する P450 分子種を詳細に検討した。

【結果・考察】

発現ヒト P450 による SMAP 生成活性

Fig. 24 にゾニサミドを基質とし、ワクシニア-HepG2 系で発現させた 10 種のヒト P450 を用いたときの SMAP 生成活性を示した。10 種の分子種のうち、CYP2C19、CYP3A4 および CYP3A5 の 3 分子種に SMAP 生成活性が認められ、他の 7 分子種においては認められなかった。SMAP 生成活性の認められた 3 つの分子種のうち、CYP3A4 の活性が最も高く、CYP2C19 および CYP3A5 の活性は、CYP3A4 のそれぞれ 1/16 および 1/11 であった。シクロスポリン、ミダゾラム、など CYP3A5 の基質選択性は CYP3A4 とほぼ同じであり、活性は CYP3A4 より低い。ゾニサミドに対してもこれらと同様であった。

10 種の発現ヒト P450 を用いた検討から、CYP3A4 以外に CYP2C19 と CYP3A5 がゾニサミドの還元的 SMAP 生成活性を有することが示された。しかし、各 P450 分子種間で活性の差が大きく認められ、本反応に対して CYP3A4 の活性が顕著に高いことが示唆された。

反応速度論的解析

SMAP 生成活性の認められた 3 つの分子種 (CYP2C19、CYP3A4、CYP3A5) およびヒト肝ミクロゾームを用いて反応速度論的解析を行なった。Fig. 25 に Lineweaver-Burk plot で示したグラフを、Table 6 にグラフから得られた K_m 、 V_{max} および V_{max}/K_m を示した。CYP2C19、CYP3A4、CYP3A5 の K_m は、それぞれ 188、247、179 μM とほぼ等しい値であったが、 V_{max} は CYP3A4 が他に比べ、6～8 倍大きい

値を示した。また、CYP2C19、CYP3A4、CYP3A5 の K_m は、ヒト肝マイクロゾームを用いた時の K_m $274\mu M$ とほぼ等しい値であった。

さらに、固有クリアランスの指標となる V_{max}/K_m においては、CYP3A4 の V_{max}/K_m は CYP2C19 の 7 倍、CYP3A5 の 5 倍大きい値を示した。

SMAP 生成活性の認められた 3 つの分子種 (CYP2C19、CYP3A4、CYP3A5) の K_m はほぼ等しい値であったが、 V_{max}/K_m には顕著な差が認められ、CYP3A4 のそれが他に比べ大きかったことから、これら 3 種のうち CYP3A4 はゾニサミドの還元的 SMAP 生成反応に対し、選択性が非常に高いことが示唆された。

また、既に、ヒト肝マイクロゾームによるゾニサミドの還元的 SMAP 生成反応に対し、抗 CYP2C9 抗体は影響を与えないことを明らかとしていることから、抗 CYP2C9 抗体と免疫交叉性を示す CYP2C19 のヒト肝における SMAP 生成反応に対する寄与は非常に低いものと考えられる。また、CYP3A5 の V_{max}/K_m が CYP3A4 のその 1/5 以下であったことと、CYP3A5 の発現には個体差が存在し 10-20% の個体に発現していること [78]、さらに発現している個体においても肝に存在する総 CYP3A の約 20% であること [79, 80] を考え合わせると、ヒト肝におけるゾニサミドの還元的 SMAP 生成反応に関与する CYP3A5 の寄与率は非常に低いものと考えられる。

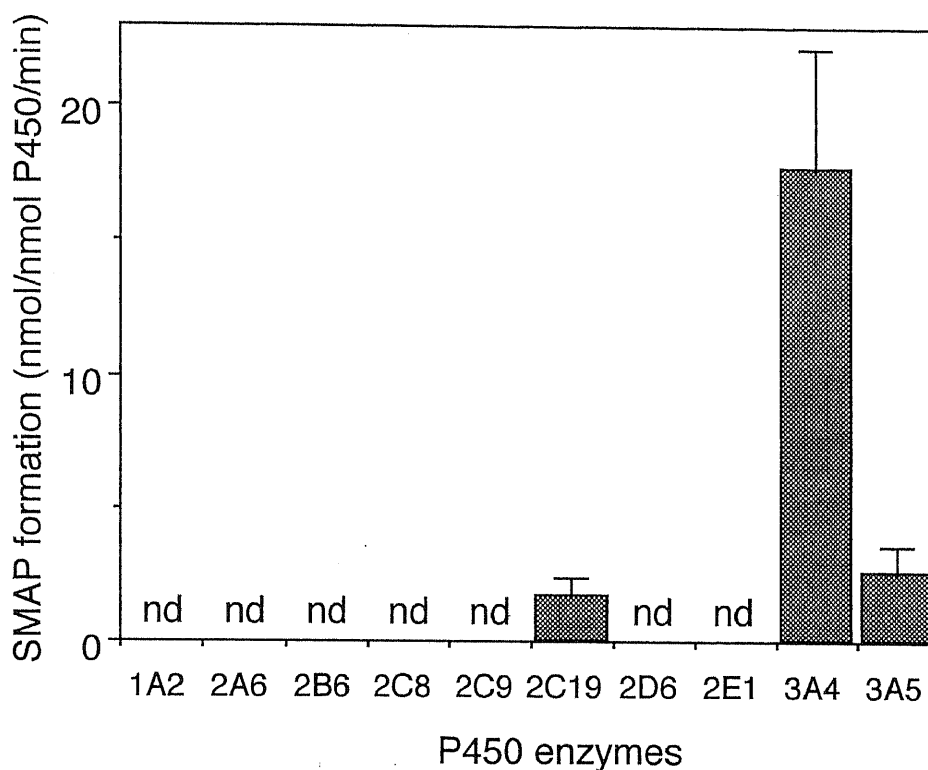


Fig. 24 SMAP formation from zonisamide by expressed human P450s
 Human P450 enzymes were expressed by using the vaccinia-Hep G2 cells system. Cell lysates were used as enzyme source in experiments. Specific contents of expressed human P450s (1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5) were 9.1, 7.8, 6.8, 8.0, 7.8, 5.0, 7.8, 8.6, 9.5 and 8.7 pmol/mg, respectively.

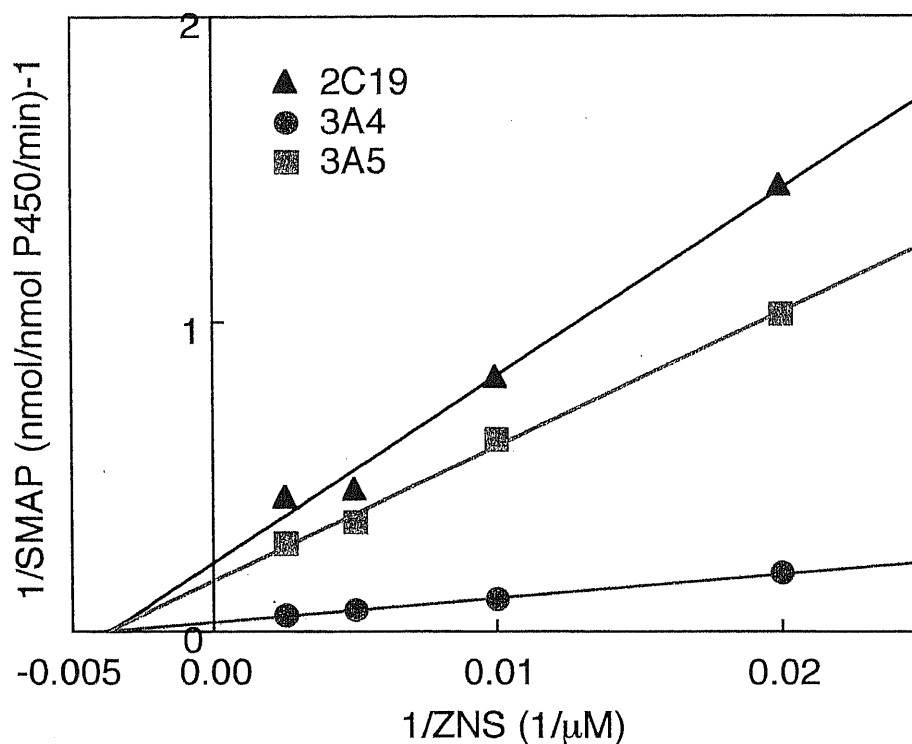


Fig. 25 Lineweaver-Burk plots for SMAP formation by expressed P450s (2C19, 3A4 and 3A5) under anaerobic conditions

Table 6 Kinetic parameters for SMAP formation by expressed P450s (2C19, 3A4 and 3A5) and human liver microsomes under anaerobic conditions

| Expressed P450s | Km (μM) | Vmax (nmol/nmol/min) | Vmax/Km |
|-----------------|---------|----------------------|---------|
| 2C19 | 188 | 3.6 | 0.019 |
| 3A4 | 247 | 33.0 | 0.134 |
| 3A5 | 179 | 4.7 | 0.026 |
| Human Liver Ms | 274 | 1.5 | 0.0055 |

第3節 小 括

ヒト肝マイクロゾームをおよび発現ヒト P450 を用いた検討から以下の知見を得た。

1) ゾニサミドはヒト肝マイクロゾームにより嫌氣的条件下において SMAP に代謝されること、さらに CYP3A に属する分子種により代謝されることが明らかとなった。

2) ゾニサミドの還元的代謝は、b5 由来の第 2 電子を必要とせず、第 1 電子で還元されていると考えられた。

3) ゾニサミドの還元的代謝の K_m は、他の CYP3A4 が基質とするシクロスポリンA、ミダゾラムの K_m に比較し、顕著に大きいことからゾニサミド代謝は他薬物による代謝阻害を受けやすい可能性が考えられた。

4) ゾニサミドは CYP3A4 のみならず、CYP2C19 および CYP3A5 も還元活性を有することが明らかとなったが、 V_{max}/K_m の比較から CYP3A4 の選択性が非常に高いことが明らかとなった。

実験の部

ヒト肝

ヒト肝は千葉大学医学部法医学研究室より司法解剖により得られたものを、木村康名誉教授、木内政寛教授よりご供与頂いた。死後 20 時間以内の肝を使用した。

発現ヒト P450

発現ヒト P450 各分子種は、Amersham 社小野博士により、ワクシニア-HEP G2 細胞系により発現 [81-83] されたものを、0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) / 1mM EDTA / 20% グリセロールを加えたのち超音波細胞破碎機を用いて懸濁することによりセルライセートとして用いた。

試薬

第 1 章の実験の部に記した。

ヒト肝ミクロゾーム調製法

ヒト肝ミクロゾームは常法により調製した。即ち、裁断した肝を 1.15% の KCl 溶液にて洗浄し血液をできるだけ除去した後、肝重量の 3 倍容のホモジナイズ溶液 (1.15 % KCl、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、1 mM EDTA、0.5 mM DTT) を加えホモジナイズし、冷却遠心機にて 9,000×g で 20 分間遠心分離した。得られた上清をさらに 105,000×g で 60 分間超遠心し、その沈殿を再度ホモジナイズ溶液を加えホモジナイズした後、105,000×g で 30 分間超遠心した。再度この操作を行った後、得られた沈殿を 0.1 mM EDTA を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に懸濁しヒト肝ミクロゾームとした。

タンパク定量および Cytochrome P450 含量の測定

第 1 章の実験の部に記した方法と同様に行った。

SMAP 生成活性

ヒト肝ミクロゾームを用いる他は、反応溶液の組成および反応操作は第 1 章と同様に行った。代謝物の抽出操作は、内部標準物質として 0.4 mg/mL ブロムワレリル尿素メタノール溶液 100 μ L を添加した他は、第 1 章と同様に行った。

HPLCによるSMAPの定量条件

第1章に記した方法と同様に行った。

酸素濃度の影響

ツンベルグ管中に反応混合液を作製し、ツンベルグ管のアーム部にインキュベート済のNADPH生成系を入れ密栓した後、バキュームフラッシュ法により種々酸素濃度ガスとガス交換を行なうことにより、酸素濃度の調整を行なった。濃度調整ガスは、3.5リットル瓶（ガロン瓶）に1%酸素ガス（補整ガス；窒素）を必要量水中補集した後、窒素ガスで希釈補整を行ない作製した。酸素濃度は1, 0.1, 0.01%とした。また、アルゴンガスおよびアルゴンガスと酸素消費系（グルコース、グルコースオキシダーゼ、カタラーゼ）を用いた場合、さらに好氣的条件においても行なった。

イムノプロット分析

第1章に記した方法と同様に行った。

アニリン水酸化活性

反応溶液（全量1 mL）は、100 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 7.4）、0.1 mM EDTA、5 mM アニリン、ミクロゾームおよびNADPH-生成系（0.33 mM NADP⁺、8 mM グルコース 6-リン酸、0.1 U グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ、6 mM 塩化マグネシウム）からなり、試験管中に作成した。37°Cで5分間プレインキュベートしたNADPH-生成系の添加により反応を開始した。37°Cで15分の反応の後、Imaiらの方法[84]により生成した*p*-アミノフェノールを定量した。

ベンツフェタミンN-脱メチル化活性

反応溶液（全量1 mL）は、100 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）、0.1 mM EDTA、1 mM アニリン、ミクロゾームおよびNADPH-生成系（0.33 mM NADP⁺、8 mM グルコース 6-リン酸、0.1 U グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ、6 mM 塩化マグネシウム）からなり、試験管中に作成した。37°Cで5分間プレインキュベートしたNADPH-生成系の添加により反応を開始した。37°Cで15分の反応の後、Nashの方法[85]により生成したホルムアルデヒドを定量した。

イミプラミン2-水酸化活性

反応溶液（全量 1 mL）は、100 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）、0.1 mM EDTA、200 μ M イミプラミン、ミクロゾームおよび NADPH-生成系（0.33 mM NADP⁺、8 mM グルコース 6-リン酸、0.1 U グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ、6 mM 塩化マグネシウム）からなり、試験管中に作成した。37°C で 5 分間プレインキュベートした NADPH-生成系の添加により反応を開始した。37°C で 10 分の反応の後、Ohmori らの方法 [70] により生成した代謝物を HPLC により定量した。

テストステロン 6 β -水酸化活性

反応溶液（全量 1 mL）は、100 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）、0.1 mM EDTA、200 μ M テストステロン、ミクロゾームおよび NADPH-生成系（0.33 mM NADP⁺、8 mM グルコース 6-リン酸、0.1 U グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ、6 mM 塩化マグネシウム）からなり、試験管中に作成した。37°C で 5 分間プレインキュベートした NADPH-生成系の添加により反応を開始した。37°C で 10 分の反応の後、Hayashi らの方法 [86] により生成した代謝物を HPLC により定量した。

抗体添加による代謝

第 1 章に記した方法に準じて行った。

精製酵素および抗体

CYP2C9 はヒト肝より、Shimada らにより報告された方法 [87] で精製したものをを用いた。CYP3A4 はヒト肝より、Komori らの方法 [88] により精製したものをを用いた。fp2 はフェノバルビタール前処理雄性ラット肝より、Yasukochi と Masters の方法 [58] を若干変更した、Kitada ら [59] の方法により精製したものをを用いた。b5 はラット肝より、Ohmori らの方法 [89] により精製したものをを用いた。抗体は精製酵素を抗原とし、雄性日本白色ウサギに精製酵素を感作し、Kamatagi らの方法 [61] を改変して、Kitada らの方法 [62] により作成した。CYP2D6 と交差反応する抗 CYP2D1 抗体は、F. P. Guengerich 博士よりご供与頂いたものをを用いた。

Michaelis-Menten パラメータの算出

SMAP 生成反応の Michaelis-Menten パラメータの算出には、Yamaoka らの非線形最小二乗法プログラム MULTI [90] をを用いた。

第3章 ヒトにおける代謝的相互作用の予測

薬物個々の代謝に関与する酵素、分子種を同定することは複数の薬物併用時の薬物間相互作用の可能性を考える上で有用な情報を与えるが、必ずしも十分な情報とはいえない。つまり、併用薬が同一酵素で代謝される薬物であっても、代謝における相互作用を必ず生ずるとも限らず、また、影響を与える薬物と影響を受ける薬物の判断はつかない。

ゾニサミドは難治性てんかんに対して使用されること [11-15] から、薬物併用がなされやすい薬物である。また、ゾニサミドは、体内動態が非線形性を示すことも報告されており [63, 64]、薬物併用による代謝レベルでの相互作用により、体内動態は大きく影響を受ける可能性が考えられる。ゾニサミドの多剤併用の可能性および体内動態の特性から考え、ヒト肝ミクロゾームを用い、*in vitro* においてゾニサミドと他薬物との代謝レベルでの薬物間相互作用を反応速度論的に解析し、*in vitro* データから *in vivo* におけるクリアランスの変動の予測を行なった。

第1節 ヒト肝マイクロゾームによるゾニサミド代謝の薬物相互作用

ゾニサミド代謝に CYP3A4 が他の分子種に比較し選択的ともいえる程の寄与率であることが発現系の実験から明らかになったことから、この反応に対する他薬物の影響を、ヒト肝マイクロゾームを用いてゾニサミド基質濃度 $100\mu\text{M}$ ($21.2\mu\text{g}/\text{mL}$) で検討した。

まず、ゾニサミドは主に難治性てんかんに対して用いられることが多く、抗てんかん薬同志の薬物併用がなされる場合がしばしば生じることから、ゾニサミドと併用されることのある、臨床上汎用される抗てんかん薬の影響を検討した。さらに、主に CYP3A により代謝される薬物および CYP3A の代表的阻害剤であるアゾール系薬物について検討した。

【結果・考察】

フェノバルビタール、バルプロ酸、フェニトイン、プリミドン各 1mM において代謝阻害は認められなかったが、カルバマゼピン 1mM では 70% の阻害が認められた (Table 7)。ゾニサミド $100\mu\text{M}$ ($21\mu\text{g}/\text{mL}$) に対して、 10 倍濃度の 1mM フェノバルビタール ($232\mu\text{g}/\text{mL}$)、バルプロ酸 ($252\mu\text{g}/\text{mL}$)、フェニトイン ($144\mu\text{g}/\text{mL}$)、プリミドン ($218\mu\text{g}/\text{mL}$) は、治療域での最高血中濃度の約 $3\sim 12$ 倍であることから、臨床上的相互作用の可能性は非常に低いものと考えられた。また、カルバマゼピンは CYP3A4 により主にカルバマゼピン- $10,11$ -エポキシドに代謝される [91] ことから、酵素の拮抗による代謝阻害が生じたものと考えられるが、 IC_{50} は $500\mu\text{M}$ ($118\mu\text{g}/\text{mL}$) と治療域での最高血中濃度の約 10 倍であり、カルバマゼピンによるゾニサミド代謝阻害の程度は強いとは言えないと考えられた。

一方、カルバマゼピンは臨床用量において CYP3A を誘導する [92, 93] ことが知られており、カルバマゼピンのゾニサミド代謝への影響は阻害と誘導の両面により生じることが考えられる。カルバマゼピンとゾニサミドの併用からカルバマゼピンを減量するにつれ、ゾニサミド血中濃度が上昇した八木らの症例 [21] は、カルバマゼピンによる酵素誘導に起因するものと推察された。したがって臨床的には誘導の影響が阻害よりも強く現れると考えられる。

代謝に CYP3A4 の関与が知られている薬物の、ゾニサミド代謝へ及ぼす影響について検討したところ、シクロスポリン A $1\mu\text{M}$ 、ケトコナゾール $4\mu\text{M}$ 、ジヒドロエルゴタミン、トリアゾラムで顕著な阻害が認められ、ジアゼパム、テルフェナジン、エリスロマイシン、リドカインで中程度の阻害が認められた (Fig. 26)。

そこで、ゾニサミド代謝阻害の認められた薬物の阻害強度を IC_{50} により比較するため、阻害剤濃度の影響を検討した (Fig. 27)。その結果、ジヒドロエルゴタミン、シクロスポリンA ; $0.1 \mu M$ 、ケトコナゾール ; $0.15 \mu M$ 、トリアゾラム ; $12 \mu M$ であり、これらの阻害程度が強いことが確認された。また、これら以外の薬物の IC_{50} はジアゼパムおよびエリスロマイシンで $100 \mu M$ 、その他は $200 \mu M$ 以上であった。CYP3A4 が代謝に関与する薬物においてもその阻害の影響は必ずしも同じではないことが示された。

さらに、阻害定数 (K_i) を Dixon Prot で求めた (Fig. 28) ところ、ジヒドロエルゴタミン、シクロスポリンA、ケトコナゾール、イトラコナゾールの K_i は約 $0.2 \mu M$ と非常に強い阻害を示すことが確認された (Table 8)。

Table 7 Effect of anti-epileptic drugs on SMAP formation from zonisamide in human liver microsomes

| Inhibitor | SMAP formation (nmol/mg/min) |
|----------------------|------------------------------|
| Control | 0.081 ± 0.002 |
| Phenobarbital (1 mM) | 0.106 ± 0.003 |
| Valproic acid (1 mM) | 0.070 ± 0.003 |
| Phenytoin (1 mM) | 0.077 ± 0.002 |
| Primidone (1 mM) | 0.082 ± 0.001 |
| Carbamazepine (1 mM) | 0.025 ± 0.004 |

Each value represents the mean of duplicate determinations. Specific content of human liver microsomes was 0.38 nmol/mg.

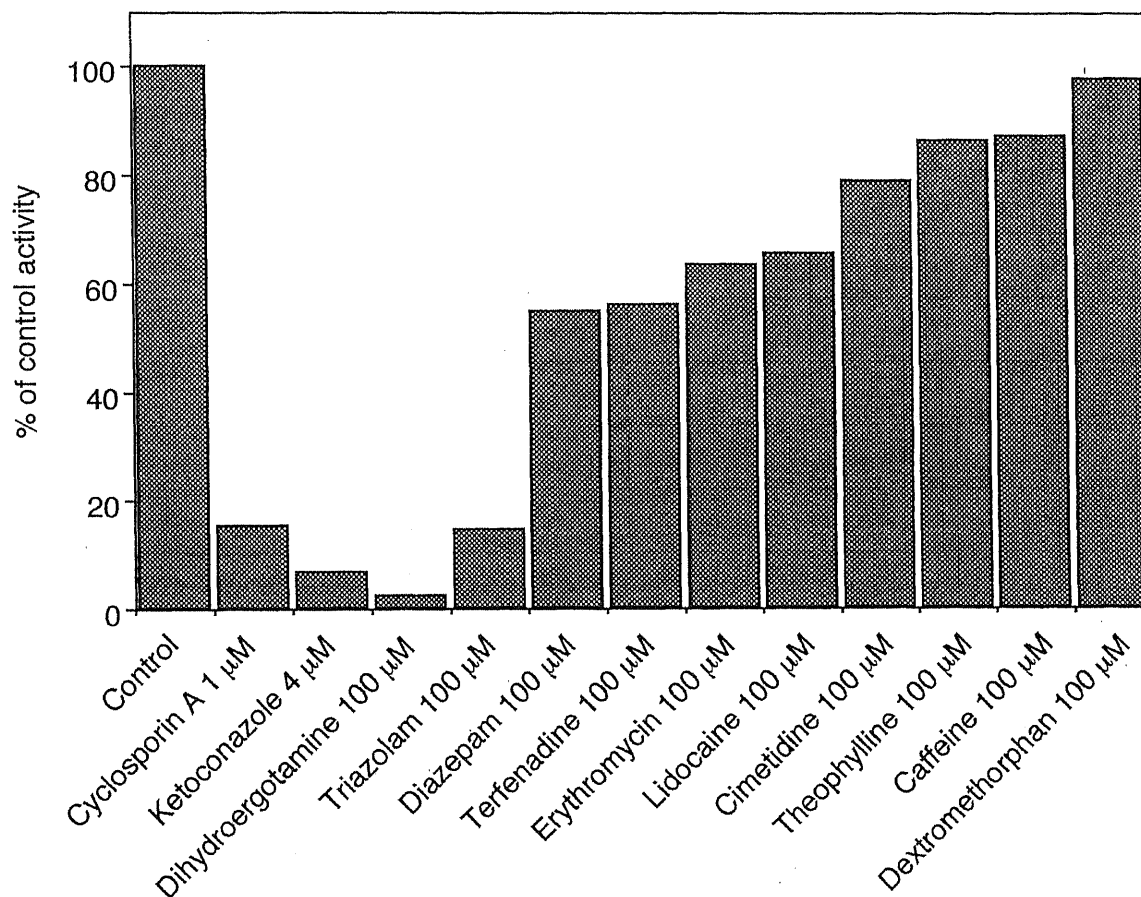


Fig. 26 Effects of various drugs on SMAP formation in human liver microsomes
 Each value represents the mean of duplicate determinations. Control value was 0.128 nmol/mg/min.

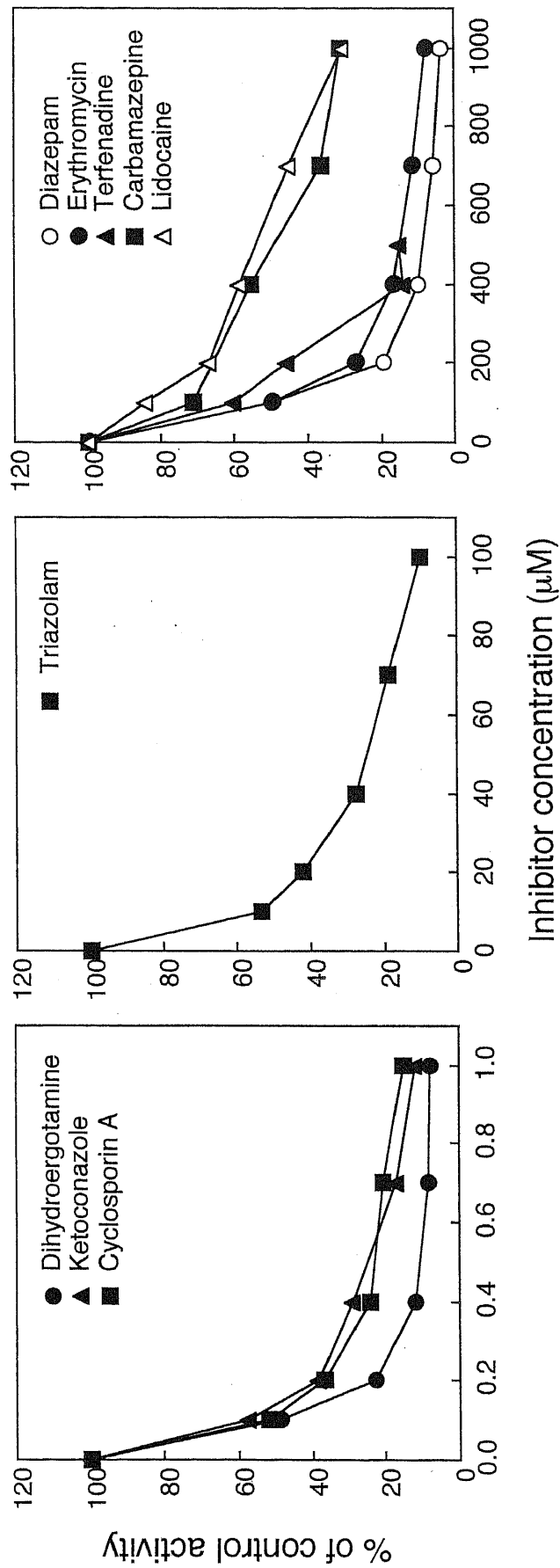


Fig. 27 Degree of inhibition of various drugs on zonisamide metabolism in human liver microsomes. Each value represents the mean of duplicate determinations. The range of control values were 0.097 to 0.128 nmol/mg/min.

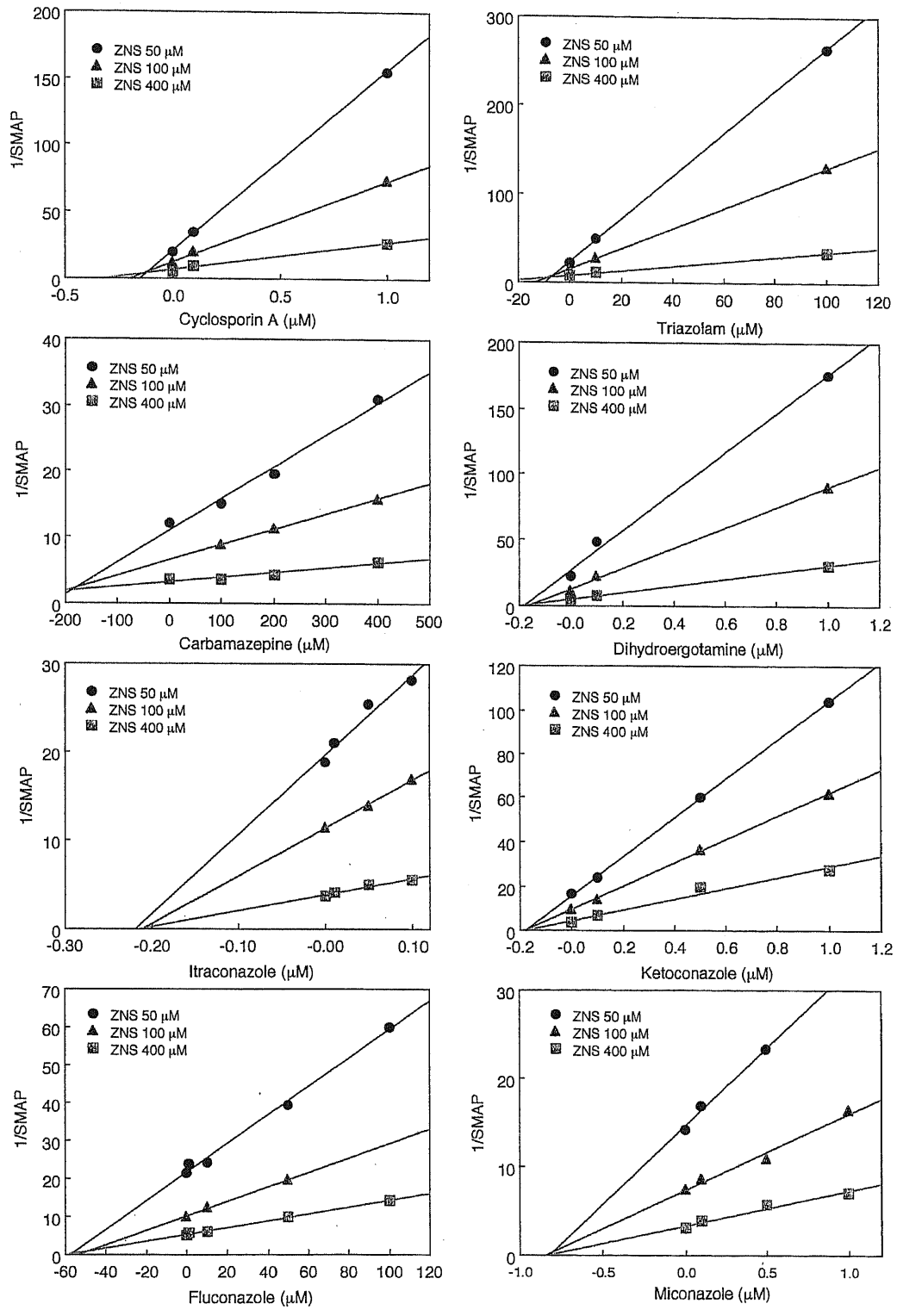


Fig. 28 Dixon plots analysis of SMAP-producing activity from zonisamide in human liver microsomes

第2節 *in vitro* データから *in vivo* での相互作用の発現の予測

前節において、抗てんかん薬および CYP3A が代謝に関与する薬物のゾニサミド代謝に与える影響を *in vitro* において検討したところ、薬物によりその影響度は異なることが明らかとなった。しかし、あくまで *in vitro* での結果であり、ヒトでの臨床使用において影響を与えるかどうかは問題となる。しかし、倫理的な問題から相互作用の臨床試験を行うことは容易ではない。そこで、ヒト肝マイクロゾームを用いた *in vitro* の実験から得られた結果を基に、ゾニサミドと他薬物を臨床用量で併用した際に生じるゾニサミド代謝クリアランスへの影響を予測することを行った。

【仮定および反応速度式】

今回の予測は、1) 併用薬のゾニサミド代謝阻害機序は競合阻害であること、2) ゾニサミドは臨床用量範囲において線形体内動態を示すこと、3) 細胞内の代謝酵素近傍の薬物濃度は、血中の非結合型薬物濃度と等しいこと、以上三つの仮定の元に行った。

薬物代謝に関して併用薬の競合阻害を仮定した場合の肝代謝固有クリアランス (CL_{int}) は、一般的に (1) 式で表せられる。 [94]

$$CL_{int} = V_{max} / (K_m (1 + I/K_i) + C) \quad \dots\dots\dots (1)$$

K_m、V_{max}、I、K_i、C はそれぞれゾニサミド代謝の Michaelis 定数、ゾニサミドの最大代謝速度、他薬物 (阻害薬) の濃度、他薬物のゾニサミド代謝に対する阻害定数、ゾニサミドの濃度を表す。

I、C は *in vivo* に置き換えてみると細胞内の代謝酵素近傍の薬物濃度であるが、これを求めるのは困難であるため、血中の非結合型薬物濃度で仮定すると (1) 式は (2) 式となる。

$$CL_{int} = V_{max} / (K_m (1 + I_u/K_i) + C_u) \quad \dots\dots\dots (2)$$

I_u、C_u はそれぞれ他薬物、ゾニサミドの血中非結合型薬物濃度を表す。K_m ≫ C_u であると仮定すると、さらに (3) 式となる。

$$CL_{int} = V_{max} / K_m (1 + I_u/K_i) \quad \dots\dots\dots (3)$$

これより、薬物併用時のクリアランスの減少%は (4) 式となる。

$$\text{Decreased percentage of predicted clearance (\%)} = 100 - 100 / (1 + I_u/K_i) \quad \dots\dots (4)$$

そこで、ヒト肝マイクロゾームを用いた *in vitro* の代謝実験より併用薬物の K_i を実験的に求めた。K_i および文献情報より得た I_u を用い (4) 式よりクリアランスの減少%を算出した。

【結果】

in vitro において阻害程度の強かった薬物の臨床用量における相互作用の予測を行なうために、各阻害剤のゾニサミド代謝への阻害定数 (K_i) を実験的に求め (Fig. 28)、文献的に得た蛋白非結合率 (u) および臨床用量における阻害剤の最高血中非結合型濃度 (I_{max}) から (95-102)、クリアランスの変動の指標となる $1/(1 + I_{max}/K_i)$ を計算し、Table 8 に示した。

実験的に求めた K_i は、シクロスポリン、ジヒドロエルゴタミン、アゾール系抗真菌薬であるケトコナゾール、イトラコナゾールでは、 K_i は約 $0.2 \mu\text{M}$ と非常に小さい値であった。一方、アゾール系抗真菌薬であるフルコナゾールでは、 K_i は $61.4 \mu\text{M}$ であった。さらに、CYP3A4 の基質であるカルバマゼピンでは今回検討した薬物の中で最も大きい K_i を示した。

クリアランスの変動の指標である $1/(1 + I_{max}/K_i)$ の値から、併用薬物の臨床用量におけるゾニサミドクリアランスへの影響を予測したところ (Table 8)、ケトコナゾール、シクロスポリン、ミコナゾールでは各31%、23%、17%の減少と推定された。フルコナゾールとカルバマゼピンでは、約5~6%の減少と推定された。一方、イトラコナゾール、ジヒドロエルゴタミン、トリアゾラムでは *in vitro* では代謝阻害を示すものの、*in vivo* でのクリアランスへの影響はほとんどないと予測された。

【考察】

今回の予測から、*in vitro* の実験から阻害定数の小さいつまり薬物特性としては阻害薬となりうる可能性の高い薬物においても、臨床用量の観点から考えると *in vivo* における阻害程度は非常に小さく、併用による影響はほとんどない薬物があることが明らかとなった。

今回の予測は、代謝阻害機序は競合阻害であることを仮定して行ったが、併用薬の代謝阻害機序が非競合阻害である場合は、 K_m は影響を受けず、 V_{max} が $1/(1 + I_u/K_i)$ 倍になることから、 V_{max}/K_m で示される CL_{int} は、結果的に (3) 式で表現できることになる。したがって、非競合阻害においても競合阻害の場合と同様に $(1 + I_u/K_i)$ に影響を受けることが明らかである。

また、ゾニサミドが非線形体内動態を示す場合においては、

$C_u > K_m$ であることから、 $C_u = a \cdot K_m$ ($a > 0$) としたとき、(2) 式は (5) 式となり、
 $CL_{int} = V_{max} / K_m (a + 1 + I_u/K_i)$ …………… (5)

$(a + 1 + I_u/K_i) > (1 + I_u/K_i)$ であることから、非線形体内動態の場合の方が、線形体内

動態のときよりも影響が大きく出てくることとなる。したがって、線形動態を仮定した今回のクリアランス変化率よりもさらに大きい変化を生じる可能性がある。

また、細胞内の代謝酵素近傍の薬物濃度は、血中の非結合型薬物濃度と等しい [94] こととしたが、肝内への薬物取り込みについては、現時点でゾニサミドの肝内取り込みに輸送系の関与の報告がないことから、血漿タンパク非結合型のゾニサミドが拡散により細胞内に移行するものとした。また、併用薬についても同様の機序を仮定したが、これらについては、臨床用量における肝内濃度を正しく評価することが今後予測性を向上させる上で必要と考えられる。

Table 8 Prediction from in vitro data of change of zonisamide clearance by other drugs

| | Ki (μM) ^{a)} | u | I _{max} (μM) | 1 + I _{max} /Ki | Decrease % of predicted clearance b) | ref |
|-------------------|------------------------------------|-------|------------------------------------|--------------------------|--|-------|
| Ketoconazole | 0.18 | 0.012 | 0.08 | 1.4444 | 30.8 | [95] |
| Cyclosporin A | 0.19 | 0.1 | 0.057 | 1.3000 | 23.1 | [96] |
| Miconazole | 0.84 | 0.020 | 0.1682 | 1.2003 | 16.7 | [97] |
| Fluconazole | 61.4 | 0.879 | 0.0287 | 1.0005 | 6.2 | [98] |
| Carbamazepine | 180 | 0.2 | 10.1583 | 1.0564 | 5.3 | [99] |
| Itraconazole | 0.22 | 0.002 | 0.0014 | 1.0064 | 0.6 | [100] |
| Dihydroergotamine | 0.19 | 0.07 | 0.0012 | 1.0063 | 0.6 | [101] |
| Triazolam | 8.19 | 0.099 | 0.0014 | 1.0002 | 0.0 | [102] |

a) Human liver microsomes of which specific content was 0.38 nmol/mg were used for inhibition study

b) Predicted change of clearance (%) = $100 - 100 / (1 + I_{\text{max}} / \text{Ki})$

第3節 小 括

ヒト肝ミクロゾームを用いた *in vitro* における代謝阻害実験から、*in vivo* でのクリアランスの変動の予測を行い、以下の知見を得た。

1) ゾニサミドと併用されることのある、臨床上汎用される抗てんかん薬の影響を *in vitro* で検討したところ、フェノバルビタール、バルプロ酸、フェニトイン、プリミドンにおいて代謝阻害は認められなかったが、カルバマゼピンでは代謝阻害が認められた。

2) 主に CYP3A4 により代謝される薬物および CYP3A4 の代表的阻害剤であるアゾール系薬物について検討したところ、ジヒドロエルゴタミン、シクロスポリンA、ケトコナゾール、イトラコナゾールの K_i は約 $0.2\mu\text{M}$ と非常に強い阻害を示すことが確認された。

3) *in vitro* での阻害データおよび文献情報をもとに *in vivo* でのクリアランス変動を予測したところ、 K_i の非常に小さく阻害程度の強いと考えられる薬剤においてもゾニサミド代謝クリアランス変動を生じる場合は少ないことが明らかとなった。

実験の部

試薬

カルバマゼピン、シクロスポリンA、ジヒドロエルゴタミンは、ノバルティスファーマよりご供与頂いた。バルプロ酸、トリアゾラム、テルフェナジン、デキストロメトルファン、リドカインは、それぞれ、協和醗酵、ファルマシア・アップジョン、日本ヘキスト・マリオン・ルセル、塩野義製薬、アストラジャパンからご供与頂いた。

ケトコナゾール、イトラコナゾールはヤンセン協和より、ミコナゾールは持田製薬より、フルコナゾールはファイザー製薬よりご供与頂いた。

その他の試薬については、第1章および第2章に記したのと同様である。

ヒト肝およびヒト肝ミクロゾーム調製法

第2章に記した。

タンパク定量および Cytochrome P450 含量の測定

第1章に記した方法と同様に行った。

SMAP 生成活性

ヒト肝ミクロゾームを用いる他は、基本的な反応溶液（全量 1 mL）の組成は、ゾニサミド濃度を 100 μ M にした以外は第1章の方法と同様であるが、ツンベルグ管の代わりにキャップ付き試験管に反応液を作成し、試験管内にアルゴンガスを封入した。37°Cで5分間プレインキュベートした NADPH-生成系の添加により反応を開始した。20分の反応の後、ジクロロメタン 7 mL を試験管に加えることにより反応を停止させた。内部標準物質として 0.5 mg/mL ブロムワレリル尿素メタノール溶液 100 μ L を添加した後、10分間振盪しジクロロメタンに抽出した。1,600 \times g で10分間遠心分離した後、有機層を分取し、ロータリーエバポレーターで有機層を減圧留去後、残渣をメタノール 100 μ L に溶解し HPLC にインジェクトした。

HPLC による SMAP の定量条件

ポンプ ; dual-delivery pump (HITACHI L-6000)

検出器 ; UV absorbance detector (HITACHI L-4200)

レコーダー ; chromato-integrator (HITACHI D-2500)

カラム ; Inertsil ODS-2 column (particle size 5 μ m, 4.6 x 250 mm, GL Science)

カラム温度 ; 35 $^{\circ}$ C

移動相 ; 0.1 M リン酸カリウム緩衝液(pH 4.0) : アセトニトリル : 2-プロパノール
(150 : 30 : 4, v/v)

流速 ; 0.9 mL/min

検出波長 ; 260 nm

内部標準物質 ; ブロムワレリル尿素

総括

1) ゾニサミドを基質とした *in vitro* の反応系で生成する主代謝物である SMAP の HPLC での定量を可能とした。

2) ゾニサミドはラットおよびヒト肝ミクロゾーム画分の NADPH を電子供与体とする酵素により嫌気的および好气的条件下において還元的に SMAP に代謝されること、さらに、この代謝には CYP3A に属する分子種が関与していることを明らかとした。

3) ヒトにおいては CYP3A4 のみならず、CYP2C19 および CYP3A5 も還元活性を有するが、 V_{max}/K_m の比較から CYP3A4 の選択性が非常に高いことが明らかとなった。

4) ゾニサミドの還元的 SMAP 生成反応に対し、酸素は非拮抗阻害を示すこと、さらにゾニサミドの還元的代謝は、b5 由来の第 2 電子を必要とせず、第 1 電子で還元されていると考えられた。

5) ゾニサミドと併用されることのある、临床上汎用される抗てんかん薬の影響を *in vitro* で検討したところ、フェノバルビタール、バルプロ酸、フェニトイン、プリミドンにおいて代謝阻害は認められなかった。また、カルバマゼピンは代謝阻害を生じるものの、CYP3A4 の誘導による影響が阻害の影響より大きいと考えられた。

6) 主に CYP3A4 により代謝される薬物および CYP3A4 の代表的阻害剤であるアゾール系薬物について *in vitro* での阻害データおよび文献情報をもとに *in vivo* でのクリアランス変動を予測したところ、ケトコナゾール、シクロスポリン A、ミコナゾールで最大約 20~30% のクリアランスの減少を生じ、他の K_i の非常に小さく阻害程度の強いと考えられる薬剤においてはゾニサミド代謝クリアランス変動を生じることは少ないと考えられた。

多剤併用がなされることの多い臨床において、薬物相互作用を回避することは薬剤師の果たすべき役割の一つである。薬物相互作用に関する情報を文献検索すると、多くの相互作用ポジティブな結果が検索に掛かってくる。しかし、特定の薬剤で相互作用の情報を検索した場合、情報が得られない場合も多く生じる。これを、相互作用を生じない

と解釈できるとは限らない。このような時、既存の情報を利用し、薬物相互作用を予測することが必要となってくる。本研究では、ラットおよびヒト肝ミクロゾームさらに発現ヒト P450 を用い、ゾニサミド代謝に関与する酵素の同定を行い、さらに、ヒト肝ミクロゾームを用いた *in vitro* での阻害データから *in vivo* での代謝クリアランス変動の予測つまり薬物相互作用発現の予測を行ったものである。疾患の特性からゾニサミドは長期服用され、また体内動態ではゾニサミドの非線形体内動態という特徴がある。それゆえ、本研究の薬物相互作用の予測は臨床において有意義なことであると考えられる。

参考文献

1. Gastaut H, WHO 国際てんかん用語委員会共編：和田豊治訳、てんかん事典、金原出版（東京）、1974
2. 細川 清、久郷敏明共著：てんかんの合理的薬物治療、新興医学出版（東京）、1987
3. Commission on classification and terminology of ILAE: Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia.*, 22, 489-501, 1981
4. Commission on classification and terminology of ILAE: Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia.*, 26, 268-278, 1985
5. Riva R, Albani F, Contin M and Baruzzi A: Pharmacokinetic interactions between antiepileptic drugs. Clinical considerations. *Clin. Pharmacokinet.*, 31, 470-493, 1996
6. Reife RA: Assessing pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions in clinical trials of antiepileptic drugs. *Adv. Neurol.*, 76, 95-103, 1998
7. Spina E and Perucca E: Clinical significance of pharmacokinetic interactions between antiepileptic and psychotropic drugs. *Epilepsia.* 43 Suppl. 2, 37-44. 2002
8. 中村 均、大森 栄、北田光一、望田 篤：医薬品相互作用の防止とその対策ーソリブジン事件が薬剤師に与えた教訓ー. *J. Toxicol. Sci.*, 19, App. 89-93, 1994

9. 厚生省薬務局安全課：テルフェナジン錠（商品名：トリルダン）の適正使用。緊急安全性情報 No.96-6, 1996
10. Uno H and Kurokawa M: Studies on 3-substituted 1,2-benzisoxazole derivative. VI: synthesis of 3-(sulfamoylmethyl)-1,2-benzisoxazole and their anticonvulsant activities. *J. Med. Chem.* 22, 180-183, 1979
11. Ramsay RE, Wilder BJ, Sackellares JC, Browne T, Guterman A, Barnes D, Mathews J, Berent S, Donofrio PD, Abou-Khall B and Wager JG: Multicenter study on the efficacy of zonisamide in the treatment of medically refractory complex partial seizures. *Epilepsia*, 25, 673, 1984
12. Sackellares JC, Donofrio PD, Wagner JG, Abou-Khall B, Berent S and Aasved-Hoyt K: Pilot study of zonisamide (1,2-benzisoxazole-3-methanesulfonamide) in patient with refractory partial seizures. *Epilepsia*, 26, 206-211, 1985
13. Wilensky AJ, Friel PN, Ojemann LM, Dodrill CB, McCormick KB and Levy RH: Zonisamide in epilepsy: a pilot study. *Epilepsia*, 26, 212-220, 1985
14. Ono T, Yagi K and Seino M: Clinical efficacy and safety of a new anti-epileptic drug, zonisamide; a multi-institutional phase three study. *Clin. Psychiat. (in Japanese)*, 30, 471-482, 1988
15. Shuto H, Sugimoto T, Yasuhara A, Hatanaka T, Woo M, Murakami K, Araki A and Kobayashi Y: Efficacy of zonisamide in children with refractory partial seizures. *Curr. Ther. Res.*, 45, 1031-1036, 1989
16. Peters DH and Sorkin EM: Zonisamide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in epilepsy. *Drugs*, 45, 760-87, 1993

17. 緒方 明、沼田陽市、宮本憲司朗、宮川太平：新抗てんかん薬 zonisamide によるてんかん治療（第三相試験）-単剤治療と多剤治療-。精神科治療学、2, 433-439, 1987
18. Kumagai N, Seki T, Yamawaki H, Suzuki N, Kimiya S, Yamada T, Hara M, Hashimoto R, Takuma Y and Hirai K: Monotherapy for childhood epilepsies with zonisamide. Jpn. J. Psychiatry. Neurol., 45, 357-359, 1991
19. 八木和一、関 亨：ゾニサミドの世界、著効100症例集、創造出版（東京）1994
20. Ojemann LM, Shastri RA, Wilensky AJ, Friel PN, Levy RH, McLean JR and Buchanan RA: Comparative pharmacokinetics of zonisamide (CI-912) in epileptic patients on carbamazepine or phenytoin monotherapy. Therap. Drug Monit., 8: 293-296, 1986
21. 八木和一、清野昌一、三原忠紘、鳥取孝安、沼田陽市、辻 正保、井上有史、工藤達也、渡辺裕貴、村中秀樹：新規抗てんかん薬ゾニサミド（zonisamide, ZNA）の臨床第二相試験。精神医学、29, 111-119, 1987
22. 福島克之、八木和一、清野昌一、藤原建樹、渡辺雅子、村中秀樹、工藤達也、岡部 稔、大谷和正、寺内 昇、沼田陽市：小児てんかん患者に行った新規抗てんかん薬ゾニサミド（zonisamide, ZNA）の臨床第二相試験。小児科臨床、40, 3389-3397, 1987
23. 香坂雅子、角 哲雄、千葉達雄、田中 哲、森 直樹、福島順子、山下 格、山内俊雄：難治てんかんに対する Zonisamide 長期投与の効果。臨床医薬、3, 1343-1352, 1987
24. 田川哲三、三牧孝至、首藤寛子、杉本健郎、松岡 収、村田良輔、一色 玄、小林陽之助、藪内百治：Zonisamide (AD-810) による小児てんかんの治療-治療効果と血中濃度-。小児科診療、3, 539-543, 1988
25. Mimaki T, Sugimoto T, Murata R and Mino M: Therapeutic drug monitoring of

serum zonisamide levels in the treatment of patients with refractory seizures. Jpn. J. Therap. Drug Monit., 7: 208-214, 1990

26. 樋口輝彦、五十嵐良雄、渡辺義文、山内俊雄：新しい抗てんかん薬 Zonisamide (AD-810) の臨床使用経験. 臨床医薬、3, 711-720, 1987

27. 吉田耕治、松本堅志、景本 昭、荒河 敏、宮崎 亀：TLC/SIMS による zonisamide のラット尿中代謝物の同定. 薬物動態、4, 403-409, 1989

28. 松本堅志、吉田耕治、藤井敏彦、古川日出男、宮崎 亀、橋本昌久：[14C] Zonisamide のラット、イヌ、サルにおける代謝. 薬物動態、4, 411-418, 1989

29. Stiff DD and Zemaitis MA: Metabolism of the anticonvulsant agent zonisamide in the rat. Drug Metab. Dispos., 18, 888-894, 1990

30. Kitada M, Igarashi T, Kamataki T and Kitagawa H: Cause of decrease of ethylmorphine N-demethylase activity of lipid peroxidation in microsomes from the rat, guinea pig and rabbit. Jpn. J. Pharmacol., 27, 481-489, 1977

31. Guengerich FP: Human cytochrome P450 enzymes, in Cytochrome P450-Structure, Mechanism and Biochemistry, (P R Ortiz de Montellano. ed.), 2nd ed., Plenum Press, New York, pp473-535, 1995

32. Baldwin SJ, Bloomer JC, Smith GJ, Ayrton AD, Clarke SE and Chenery RJ: Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9. Xenobiotica, 25, 261-270, 1995

33. Gigon PL, Gram TE and Gillette JR: Effect of drug substrates on the reduction of hepatic microsomal cytochrome P-450 by NADPH. Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 558-562, 1968

34. Shargel L, Mazel P: Influence of 2,4-dichloro-6-phenoxyethylamine (DPEA)

and b-diethylaminoethyl diphenylpropylacetate (SKF-525 A) on hepatic microsomal azoreductase activity from phenobarbital or 3-methylcholanthrene induced rats. *Biochem. Pharmacol.*, 21, 69-75, 1972

35. Sundseth SS, Alberta JA and Waxman DJ: Sex-specific, growth hormone-regulated transcription of the cytochrome P450 2C11 and 2C12 genes. *J. Biol. Chem.*, 267, 3907-3914, 1992

36. Gemzik B, Greenway D, Nevins C and Parkinson A: Regulation of two electrophoretically distinct proteins recognized by antibody against rat liver cytochrome P450 3A1. *J. Biochem. Toxicol.*, 7, 43-52, 1992

37. Waxman DJ and Azaroff L: Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem. J.*, 281, 577-592, 1992

38. Shimada M, Murayama N, Yamauchi K, Yamazoe Y and Kato R: Suppression in the expression of a male-specific cytochrome P450, P450-male: Difference in the effect of chemical inducers on P450-male mRNA and protein in rat livers. *Arch. Biochem. Biophys.*, 270, 578-587, 1989

39. Pessayre D, Descatoire V, Konstantinova-Mitcheva M, Wandscheer JC, Cobert B, Level R, Benhamou JP, Jaouen M and Mansuy D: Self induction by triacetyloleandomycin of its own transformation into a metabolite forming a stable 456 nm-absorbing complex with cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.*, 30, 553-558, 1981

40. Delaforge M, Jaouen M and Mansuy D: Dual effects of macrolide antibiotics on rat liver cytochrome P-450. Induction and formation of metabolite-complex: A structure-activity relationship. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 2309-2318, 1983

41. Bodenham A, Shelly MP and Park GR: The altered pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs commonly used in critically ill patients. *Clin.*

Pharmacokinet., 14, 347-373, 1988

42. Shelly MP, Park GR and Mendel L: Failure of critically ill patients to metabolise midazolam. *Anaesthesia*, 42, 619-626, 1987

43. Jones DP, Aw TY and Shan X: Drug metabolism and toxicity during hypoxia. *Drug Metab. Rev.*, 20, 247-260, 1989

44. du Souich P, Courteau H, Kobusch AB, Dalkara AB and Ong H: Effect of hypoxia on the cytochrome P-450 and theophylline metabolism. *Eur. J. Pharmacol.*, 183, 2122-2123, 1990

45. Sipes IG, Gandolfi AJ, Pohl LR, Krishna G and Brown BR Jr.: Comparison of the biotransformation and hepatotoxicity of halothane and deuterated halothane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 214, 716-720, 1980

46. Takahara E, Ohta S and Hirobe M: Effect of oxygen concentration on the metabolic pathway of anisole in rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 35, 541-544, 1986

47. Ohi H, Takahara E, Ohta S and Hirobe M: Effects of oxygen concentration on the metabolism of anisole homologues by rat liver microsomes. *Xenobiotica*, 22, 1329-1337, 1992

48. 小西廣己、森田邦彦、小野 彪、島川治巳：肝ミクロソームの酸化的薬物代謝酵素系に対する抗てんかん薬 Zonisamide の影響。 *薬剤学*, 50, 323-328, 1990

49. Kitada M, Kamataki T and Kitagawa H: NADH-synergism of NADPH-dependent O-dealkylation of type II compounds, p-anisidine and p-phenetidine, in rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 178, 151-157, 1977

50. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement

with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275, 1951

51. Omura T and Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, 239, 2370–2378, 1964

52. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685, 1970

53. Guengerich FP, Wang P and Davidson NK: Estimation of isozymes of microsomal cytochrome P-450 in rats, rabbits, and humans using immunochemical staining coupled with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*, 21, 1698–1706, 1982

54. Englander SW, Calhoun DB and Englander JJ: Biochemistry without oxygen. *Anal. Biochem.*, 161, 300–306, 1987

55. Ryan DE, Thomas PE, Korzeniowski D and Levin W: Separation and characterization of highly purified forms of liver microsomal cytochrome P-450 from rats treated with polychlorinated biphenyls, phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.*, 254, 1365–1374, 1979

56. Kamataki T, Maeda K, Yamazoe Y, Nagai T and Kato R: Sex difference of cytochrome P-450 in the rat: purification characterization, and quantitation of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 225, 758–770, 1983

57. Komori M, Hashizume T, Ohi H, Miura T, Kitada M, Nagashima K and Kamataki T: Cytochrome P-450 in human liver microsomes: high performance liquid chromatographic isolation of three forms and their characterization. *J. Biochem. (Tokyo)*, 104, 912–916, 1988

58. Yasukochi Y and Masters BSS: Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c (cytochrome P-450) reductase purified by biospecific chromatography. *J. Biol. Chem.*, 251, 5337-5344, 1976
59. Kitada M, Sakamoto K, Rikihisa T and Kanakubo Y: The interaction between two forms of cytochrome P-450 during drug oxidation in the reconstituted system containing limited amount of NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biochem. Pharmacol.*, 33, 3971-3976, 1984
60. Ohmori S; Shirakawa C, Motohashi K, Yoshida H, Abe H, Nakamura T, Horie T, Kitagawa H, Asaoka K, Rikihisa T, Kanakubo Y and Kitada M, 1993: Purification from liver microsomes from untreated cynomolgus monkeys of cytochrome P450 closely related to human cytochrome P450 2B6. *Mol. Pharmacol.*, 43, 183-190, 1993
61. Kamataki T, Belcher DH, and Neal RA: Studies of the metabolism of diethyl p-nitrophenyl phosphorothionate (parathion) and benzphetamine using an apparently homogeneous preparation of rat liver cytochrome P-450: effect of a cytochrome P-450 antibody preparation. *Mol. Pharmacol.*, 12, 921-932, 1976
62. Kitada M, Kato T, Ohmori S, Kamataki T, Itahashi K, Guengerich FP, Rikihisa T and Kanakubo Y: Immunochemical characterization and toxicological significance of P-450HFLb purified from human fetal livers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1117, 301-305, 1992
63. Wagner JG, Sackellares JC, Donofrio PD, Berent S and Sakmar E: Nonlinear pharmacokinetics of CI-912 in adult epileptic patients. *Therap. Drug Monit.*, 6: 277-283, 1984
64. 西口工司、大西憲明、岩川精吾、奥村勝彦、八木次朗、中山慎一、高田 哲、中村肇：ゾニサミドの体内動態：難治性てんかん患者における検討。 *TDM研究*, 7, 173-178, 1990

65. Ludden TM: Nonlinear pharmacokinetics: clinical Implications. Clin. Pharmacokinet., 20, 429-46, 1991
66. Shimada T, Mimura M, Inoue K, Nakamura S, Oda H, Ohmori S and Yamazaki H: Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities in liver microsomes of various animal species including rats, guinea pigs, dogs, monkeys, and humans. Arch. Toxicol., 71, 401-408, 1997
67. Guengerich FP, Dannan GA, Wright ST, Martin MV and Kaminsky LS: Purification and characterization of liver microsomal cytochrome P-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or beta-naphthoflavone. Biochemistry, 21, 6019-6030, 1982
68. Ryan DE and Levin W: Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. Pharmacol. Rev., 45, 153-239, 1990
69. Maenpaa J, Pelkonen O, Cresteil T and Rane A: The role of cytochrome P450 3A (CYP3A) isoform(s) in oxidative metabolism of testosterone and benzphetamine in human adult and fetal liver. J. Steroid Biochem., 44, 61-67, 1993
70. Ohmori S, Takeda S, Rikihisa T, Kiuchi M, Kanakubo Y and Kitada M: Studies on cytochrome P450 responsible for oxidative metabolism of imipramine in human liver microsomes. Biol. Pharm. Bull., 16, 571-575, 1993
71. Waxman DJ, Attisano C, Guengerich FP and Lapenson DP: Human liver microsomal steroid metabolism; identification of the major microsomal steroid hormone 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. Arch. Biochem. Biophys., 263, 424-436, 1988
72. Taniguchi H, Imai Y and Sato R: Role of the electron transfer system in

microsomal drug monooxygenase reaction catalyzed by cytochrome P-450. Arch. Biochem. Biophys., 232, 585-596, 1984

73. Eberhart DC and Parkinson A: Cytochrome P450 IIIA1 (P450p) requires cytochrome b5 and phospholipid with unsaturated fatty acids. Arch. Biochem. Biophys., 291, 231-240, 1991

74. Yamazaki H, Nakano M, Imai Y, Ueng YF, Guengerich FP and Shimada T: Roles of cytochrome b5 in the oxidation of testosterone and nifedipine by recombinant cytochrome P450 3A4 and by human liver microsomes. Arch. Biochem. Biophys., 325, 174-182, 1996

75. Pichard L, Fabre I, Fabre G, Domergue J, Saint Aubert B, Mourad G and Maurel P: Cyclosporin A drug interactions. Screening for inducers and inhibitors of cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) in primary cultures of human hepatocytes and in liver microsomes. Drug Metab. Dispos., 18, 595-606, 1990

76. Gascon MP and Dayer P: In vitro forecasting of drugs which may interfere with the biotransformation of midazolam. Eur. J. Clin. Pharmacol. 41, 573-578, 1991

77. Ono S, Hatanaka T, Miyazawa S, Tsutsui M, Aoyama T, Gonzalez FJ and Satoh T: Human liver microsomal diazepam metabolism using cDNA-expressed cytochrome P450s: role of CYP2B6, 2C19 and the 3A subfamily. Xenobiotica, 26, 1155-1166, 1996

78. Gorski JC, Jones DR, Wrighton SA and Hall SD: Characterization of dextromethorphan N-demethylation by human liver microsomes: Contribution of the cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. Biochem. Pharmacol., 48, 173-182, 1994

79. Aoyama T, Yamano S, Waxman DJ, Lapenson DP, Meyer UA, Fischer V,

Tyndale R, Inaba T, Kalow W, Gelboin HV and Gonzalez FJ: Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. *J. Biol. Chem.*, 264, 10388-10395, 1989

80. Wrighton SA, Brian WR, Sari M-A, Iwasaki M, Guengerich FP, Raucy JL, Molowa DT and Vandenbranden M: Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III A5 (HLp3). *Mol. Pharmacol.*, 38, 207-213, 1990

81. Aoyama T, Yamano S, Guzelian P S, Gelboin H V, and Gonzalez F J: Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically active aflatoxin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4790-4793, 1990

82. Gonzalez FJ, Aoyama T, Gelboin HV: Expression of mammalian cytochrome P450 using vaccinia virus. *Methods Enzymol.*, 206, 85-92, 1991

83. Ono S, Tsutsui M, Gonzalez FJ, Satoh T, Masubuchi Y, Horie T, Suzuki T and Narimatsu S; Oxidative metabolism of bunitrolol by complementary DNA-expressed human cytochrome P450 isozymes in a human hepatoma cell line (Hep G2) using recombinant vaccinia virus. *Pharmacogenetics*, 5, 97-102, 1995

84. Imai Y, Ito A, and Sato R: Evidence for biochemically different types of vesicles in hepatic microsomal fraction. *J. Biochem. (Tokyo)*, 60, 417-428, 1966

85. Nash T: Colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.*, 55, 416-421, 1953

86. Hayashi S, Noshiro M and Okuda K: Isolation of a cytochrome P-450 that catalyzes the 25-hydroxylation of vitamin D3 from rat liver microsomes. *J. Biochem. (Tokyo)*, 99, 1753-1763, 1986

87. Shimada T, Misono KS and Guengerich FP: Human liver microsomal

cytochrome P-450 mephenytoin 4-hydroxylase, a prototype of genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.*, 261, 909-921, 1986

88. Komori M, Hashizume T, Ohi H, Miura T, Kitada M, Nagashima K and Kamataki T: Cytochrome P-450 in human liver microsomes: high performance liquid chromatographic isolation of three forms and their characterization. *J. Biochem. (Tokyo)*, 104, 912-916, 1988

89. Ohmori S, Misaizu T, Nakamura T, Takano N, Kitagawa H and Kitada M: Differential role in lipid peroxidation between rat P450 1A1 and P450 1A2. *Biochem. Pharmacol.*, 6, 46, 55-60, 1993

90. Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, and Uno T: A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 4, 879-885, 1981

91. Kerr BM, Thummel KE, Wurden CJ, Klein SM, Kroetz DL, Gonzalez FJ and Levy RH: Human liver carbamazepine metabolism. Role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10, 11-epoxide formation. *Biochem. Pharmacol.*, 47, 1969-1979, 1994

92. Shaw PN, Houston JB, Rowland M, Hopkins K, Thiercelin JF and Morselli PL: Antipyrine metabolite kinetics in healthy human volunteers during multiple dosing of phenytoin and carbamazepine. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 20, 611-618, 1985

93. Back DJ and Orme ML: Pharmacokinetic drug interactions with oral contraceptives. *Clin. Pharmacokinet.*, 18, 472-484, 1990

94. Bertz RJ and Granneman GR: Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin. Pharmacokinet.*, 32, 210-58, 1997

95. Heel RC, Brogden RN, Carmine A, Morley PA, Speight TM and Avery GS: Ketoconazole: a review of its therapeutic efficacy in superficial and systemic fungal infections., *Drugs*, 23, 1-36, 1982
96. Beveridge T: Pharmacokinetics and metabolism of cyclosporine A. In: White DJG (ed) Cyclosporin A. Proc Internat Conference on Cyclosporin A. Cambridge, UK, pp. 35-44, 1982
97. Uchida K and Yamaguchi H: Bioassay for miconazole and its levels in human body fluids. *Chemotherapy (Tokyo)*, 32, 541-546, 1984
98. Brammer KW, Farrow PR and Faulkner JK: Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. *Rev. Infect. Diseases*, 12 Suppl. 3, S318-S326, 1990
99. Lawless L, DeMonaco H and Muindo L: Protein binding of carbamazepine in epileptic patients. *Neurology*, 32, 415-418, 1982
100. Heykants J, Van Peer A, Van de Velde V, Van Rooy P, Meuldermans W, Lavrijsen K, Woestenborghs R, Van Cutsem J and Cauwenbergh G: The clinical pharmacokinetics of itraconazole: an overview. *Mycoses*. 32 Suppl. 1, 67-87. 1989
101. Wyss PA, Rosenthaler J, Nuesch E and Aellig WH: Pharmacokinetic investigation of oral and i.v. dihydroergotamine in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 41, 597-602, 1991
102. Jochemsen R, Wesselman JG, Van Boxtel CJ, Hermans J and Breimer DD: Comparative pharmacokinetics of brotizolam and triazolam in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 16, 291S-297S, 1983

論文目録

本論文内容は下記の発表論文による。

第1章

H. Nakasa, M. Komiya, S. Ohmori, M. Kitada, T. Rikihisa, and Y. Kanakubo:
Formation of reductive metabolite, 2-sulfamoylacetylphenol, from zonisamide in
rat liver microsomes. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 77: 31-41 (1992)

第2章の第1節

H. Nakasa, M. Komiya, S. Ohmori, T. Rikihisa, M. Kiuchi, and M. Kitada:
Characterization of human liver microsomal cytochrome P450 involved in the
reductive metabolism of zonisamide. *Mol. Pharmacol.* 44: 216-221 (1993)

第2章の第2節

H. Nakasa, S. Ohmori, and M. Kitada: The formation of 2-sulfamoylacetylphenol
from zonisamide under aerobic conditions in rat liver microsomes. *Xenobiotica* 26:
495-501 (1996)

第3章の第1節

H. Nakasa, M. Komiya, S. Ohmori, T. Rikihisa, and M. Kitada: Rat liver microsomal
cytochrome P450 responsible for reductive metabolism of zonisamide. *Drug
Metab. Dispos.* 21: 777-781 (1993)

第3章の第2節および第4章

H. Nakasa, H. Nakamura, S. Ono, M. Tsutsui, M. Kiuchi, S. Ohmori, and M.
Kitada: Prediction of drug-drug interactions of zonisamide metabolism in human
from in vitro data. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 54: 177-183 (1998)

主査および副査名

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

| | | | | |
|----|---------|-----------|------|------|
| 主査 | 千葉大学教授 | (医学部附属病院) | 薬学博士 | 北田光一 |
| 副査 | 千葉大学教授 | (薬学研究院) | 医学博士 | 上田志朗 |
| 副査 | 千葉大学教授 | (薬学研究院) | 薬学博士 | 堀江利治 |
| 副査 | 千葉大学教授 | (薬学研究院) | 薬学博士 | 矢野眞吾 |
| 副査 | 千葉大学助教授 | (薬学研究院) | 薬学博士 | 細川正清 |

謝 辞

終わりに臨み、本論文の提出の機会を与えていただき、また終始懇切な御指導と御鞭撻をいただき、さらに本論文の御校閲を賜りました、千葉大学医学部附属病院薬剤部長北田光一教授に衷心より感謝の意を表します。

本研究中、詳細かつ有益な御指導と御助言を賜りました信州大学医学部附属病院薬剤部長大森 栄教授（前千葉大学医学部附属病院助教授・副薬剤部長）に衷心より感謝の意を表します。

本研究遂行に対し、適切なる御指導御助言を賜りました前千葉大学医学部附属病院薬剤部長金久保好男教授、元千葉大学医学部附属病院副薬剤部長力久忠昭助教授（現明治薬科大学教授）に深謝致します。

本論文作成にあたり貴重な御助言を賜りました千葉大学医学部附属病院副薬剤部長有吉範高助教授、千葉大学大学院薬学研究院石井伊都子助教授に深謝致します。

また、貴重な試料の提供ならびに有益なご助言を賜りました前千葉大学医学部法医学教室木内政寛教授（現名誉教授）、アマシャム総合研究所小野 聡博士に深謝致します。

さらに、本研究に多大な御協力を頂きました小宮守善修士に心から感謝致します。

加えて、研究遂行に際し協力頂いた千葉大学医学部附属病院薬剤部の関係各位ならびに千葉大学大学院薬学研究院病院薬学研究室の関係各位に感謝致します。