

# 新生児期の薬物代謝能を考慮した 薬物投与設計に関する研究

研究課題番号 (14370779)

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金 (基盤研究(B)(2)) 研究成果報告書

平成16年3月

千葉大学附属図書館



20004818082

研究代表者 北田光一

(千葉大学医学部附属病院 教授)

# 新生児期の薬物代謝能を考慮した 薬物投与設計に関する研究

研究課題番号 (14370779)

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金 (基盤研究(B)(2)) 研究成果報告書

---

平成16年3月

研究代表者 北田光一

(千葉大学医学部附属病院薬剤部・教授)

千葉大学附属図書館



20004818082

## はしがき

薬物代謝は薬物の薬効および毒性発現を左右する重要な因子である。特に、新生児期は薬物代謝能が大きく変化する時期と考えられ、この時期に肝代謝型薬物を使用する際には、薬物代謝酵素活性の変化を考慮した慎重な投与が望まれる。しかしながら、新生児期の薬物代謝能に関する知見は極めて乏しく、薬物代謝能が出生後どのように変動するかについては不明瞭な部分が多いのが現状である。これまでに、新生児の薬物体内動態が十分理解されないまま薬物が使用されて問題になった事例として、クロラムフェニコールによる gray syndrome (1) やサルファ剤による核黄疸 (2) など枚挙にいとまがなく、現在の新生児に対する薬用量設定には理論的背景が不足していると言える。事実、医療用医薬品添付文書の「小児等への投与」の項目も“小児に対する安全性は確立されていない”と記載しているものが大半である。

薬物代謝に関与する酵素として、ヒト肝ミクロゾーム画分に存在するチトクローム P450 (CYP) は最も重要な酵素のひとつである。CYP はその一次構造の相同性から様々な分子種に分類されており (3)、ヒトにおける薬物代謝には、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 が主に関与する。その中で、CYP3A 分子種は、動物種によってその一次構造が異なるだけでなく、同一の生物においても複数の分子種が存在し、分子種間での基質に対する反応性にも相違があることが示されている。3A サブファミリーに属するヒトの酵素として CYP3A4 の他に、ヒト成人肝の約 20% で発現しているとされる CYP3A5 (4-7)、胎児特異的とされる CYP3A7 (8-11)、さらに、男性生殖器で主に発現していると言われる CYP3A43 (12-14) がある。胎児期においては、CYP3A7 がヒト胎児肝で最大 50% を占める主要な CYP 分子種であることが知られており、CYP3A4 は存在しない。一方、成人肝においては CYP3A4 が主たる CYP3A 分子種であることから、出生を境に CYP3A の組成や含量が大きく変動していることが考えられる。この CYP3A の質的、量的な変化は、新生児期の薬物代謝を考える上で極めて重要であり、これまでの報告より出生後かなり早期に変化が起きていると考えられているが (15-17)、その詳細については明らかにされていない。

また、CYP3A4 と CYP3A7 は塩基配列で 94%、一次構造で 88% の相同性を示しながらも、内因性物質に対する基質特性はかなり異なっている。たとえば、CYP3A4 活性の指標とされるテストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性は CYP3A7 では低い活性しか示さない (18)。一方、胎児期、新生児期に血中に高濃度で存在し、胎児胎盤系で妊娠の維持、出生に大きな役割を演じているデヒドロエピアンドロステロン 3-硫酸 (DHEA-S) の 16 $\alpha$ -水酸化は、CYP3A7 では高い活性を示すが、CYP3A4 にはほとんど活性が認められない (18)。この様に、内因性物質に対する基質特異性は CYP3A4 と CYP3A7 で大きく異なっていることから、薬物に対する両酵素の基質特異性も異なることが予測されるが、両酵素の薬物に対する基質特異性に関する報告は限られたものしか存在せず (18-21)、その詳細については明らかにされていない。また、前述のごとく CYP3A は薬物のみならず内因性物質、特に内因性ステロイドの代謝にも深く関与していることから、内因性ステロイドが薬物代謝に対し影響を与えることは十分に考えられる。従って、適切な薬物療法を行う上で、内因性ステロイドと医薬品との相互作用を明らかとすることは極めて重要と考えられる。

CYP による触媒反応は多くの場合 Michaelis-Menten モデルを用いて説明されるが、CYP3A4 による触媒反応は時に Michaelis-Menten モデルで説明不可能な複雑な反応速度論的特徴を示す場合がある。たとえば、CYP3A4 によるカルバマゼピン 10,11-エポキシ化やプロゲステロン 6 $\beta$ -水酸化の反応速度論曲線は、非双曲線を示すことが報告されている (22,23)。また、CYP3A4 は同一薬物の異なる部位への水酸化を触媒したり、シクロスポリンのような比較的大きな分子量 (MW: 1,201) の化合物も代謝することから、CYP3A4 の基質結合部位周辺の空間は大きい分子種であると考えられている。そのため低分子の基質の場合は、複数個がその活性部位に共存することが可能と考えられる。すなわち、CYP3A4 の基質と相互作用する大きな空間には複数の基質と相互作用し得る複数の部位が存在し、そのいずれからも活性化酸素を受け取ることが可能とするモデルが最近提唱されている。この様に CYP3A4 の複雑な反応速度論的特徴を説明するためにいくつかの仮説が提唱されているが (24-26)、CYP3A7 に関しての検討は行われていない。

本研究は、新生時期における適正な薬物投与設計を可能にするための基礎的データを得ることを目的に、新生児期の薬物代謝において特に重要と考えられる CYP3A による薬物代謝酵素活性について、*in vitro*、*in vivo* の両面から検討を行った。まず、CYP3A4 と CYP3A7 の基質特異性を明らかとする目的で、バキュロウイルス-昆虫細胞系により発現させた CYP3A4、CYP3A7 および CYP3A7 の活性部位と考えられるアミノ酸のうち CYP3A4 と異なる箇所を CYP3A4 のアミノ酸に置換した部位指向変異酵素を用いて、*in vitro* の系で各種薬物および内因性ステロイドの代謝酵素活性の差異について検討を行った (第 I 章)。次に、新生児期は成人とは異なる内因性ステロイドの分泌パターンを示すことから、生体内の各種内因性ステロイドが両酵素の薬物代謝酵素活性に如何なる影響を及ぼすかについて検討を行った。さらに、CYP3A に見られる cooperative な反応速度論について 2-binding site モデルおよび分子力場計算と密度汎関数理論により解析を行った (第 II 章、第 III 章)。次に、尿中成分を測定するといった非侵襲的な方法を用い、CYP3A 酵素活性の出生後の変化について検討を行った。すなわち、尿中 6 $\beta$ -水酸化コルチゾールおよび 16 $\alpha$ -水酸化デヒドロエピアンドロステロンをそれぞれ CYP3A、CYP3A7 活性のマーカーとし、出生後経日的に測定を行い、CYP3A の出生後の質的、量的な変化について検討を行った (第 IV 章)。最後に、ここで得られた *in vitro* および *in vivo* のデータより、新生児期における各種薬物に対する代謝能およびその出生後の変化について考察を行った。



## 研究組織

研究代表者： 北田 光一 (千葉大学医学部附属病院薬剤部・教授)  
研究分担者： 有吉 範高 (千葉大学医学部附属病院薬剤部・助教授)  
研究分担者： 石井 伊都子 (千葉大学薬学部・助教授)  
研究協力者： 中村 裕義 (千葉大学医学部附属病院薬剤部)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	12,100	0	12,100
平成15年度	2,200	0	2,200
総計	14,300	0	14,300

## 研究発表

### 論文発表

Nakamura H, Nakasa H, Ishii I, Ariyoshi N, Igarashi T, Ohmori S, Kitada M  
Effect of endogenous steroids on CYP3A4-mediated drug metabolism by human liver microsomes.  
Drug Metabo. Dispos. 30: 534-540 (2002)

Nakamura H, Torimoto N, Ishii I, Ariyoshi N, Nakasa H, Ohmori S, Kitada M  
CYP3A4 and CYP3A7-mediated carbamazepine epoxidation are activated by differential endogenous steroids.  
Drug Metabo. Dispos. 31: 432-438 (2003)

Torimoto N, Ishii I, Hata M, Nakamura H, Imada H, Ariyoshi N, Ohmori S, Igarashi T, Kitada M  
Direct interaction between substrates and endogenous steroids in the active site may change the activity of cytochrome P450 3A4.  
Biochemistry 30;42: 15068-15077 (2003)

### 学会発表

Torimoto, N, Ishii, I, Hata, M, Nakamura, H, Ariyoshi, N, Ohmori, S and Kitada, M  
Direct Interaction Between Substrates and Endogenous Steroids in Active Site May Change Activity of CYP3A4  
14 th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (2002)

小林由香、中村裕義、有吉範高、畑 晶之、石井伊都子、北田光一  
トリアゾラムと内因性ステロイドとの相互作用の密度汎関数論的解析  
第17回 日本薬物動態学会年会 (2002)

中村裕義、有吉範高、石井伊都子、鈴木貴詞、岡田賢二、中澤一純、北田光一  
発現 CYP3A7 と CYP3A4 の基質特異性の差異  
日本薬学会第123年会 (2003)

中村裕義、有吉範高、石井伊都子、中澤一純、北田光一  
発現 CYP3A7 の薬物代謝酵素活性に及ぼす内因性ステロイドの影響  
第18回 日本薬物動態学会年会 (2003)

# 研究成果

## 目 次

第 I 章	CYP3A4 と CYP3A7 の基質特異性の差異	7
第 1 節	CYP3A4 と CYP3A7 の各種薬物および内因性ステロイド代謝酵素活性の比較	10
I-1-1	実験方法	10
I-1-1-a	実験材料および試薬	10
I-1-1-b	カルバマゼピン 10,11-エポキシ化酵素活性測定法	10
I-1-1-c	ネビラピン水酸化酵素活性測定法	11
I-1-1-d	トリアゾラム水酸化酵素活性測定法	11
I-1-1-e	エリスロマイシン N-脱メチル化酵素活性測定法	12
I-1-1-f	ゾニサミド還元酵素活性測定法	12
I-1-1-g	テストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性測定法	13
I-1-1-h	コルチゾール 6 $\beta$ -水酸化酵素活性測定法	13
I-1-1-i	デヒドロエピアンドロステロン 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性測定法	14
I-1-1-j	デヒドロエピアンドロステロン 3-硫酸 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性測定法	15
I-1-1-k	アンドロステンジオン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性測定法	15
I-1-1-l	反応速度論的解析法	16
I-1-2	結 果	17
I-1-2-a	CYP3A4 と CYP3A7 の各種薬物および内因性ステロイド代謝酵素活性の比較	17
I-1-2-b	反応速度論的検討	20
第 2 節	部位指向変位導入酵素による検討	22
I-2-1	実験方法	22
I-2-1-a	実験材料および試薬	22
I-2-1-b	CYP3A7 部位指向変異酵素の作成	22
I-2-2	結 果	22
第 3 節	考 察	26
第 II 章	内因性ステロイドの CYP3A 活性に及ぼす影響	28
第 1 節	発現酵素による検討	28
II-1-1	実験方法	28

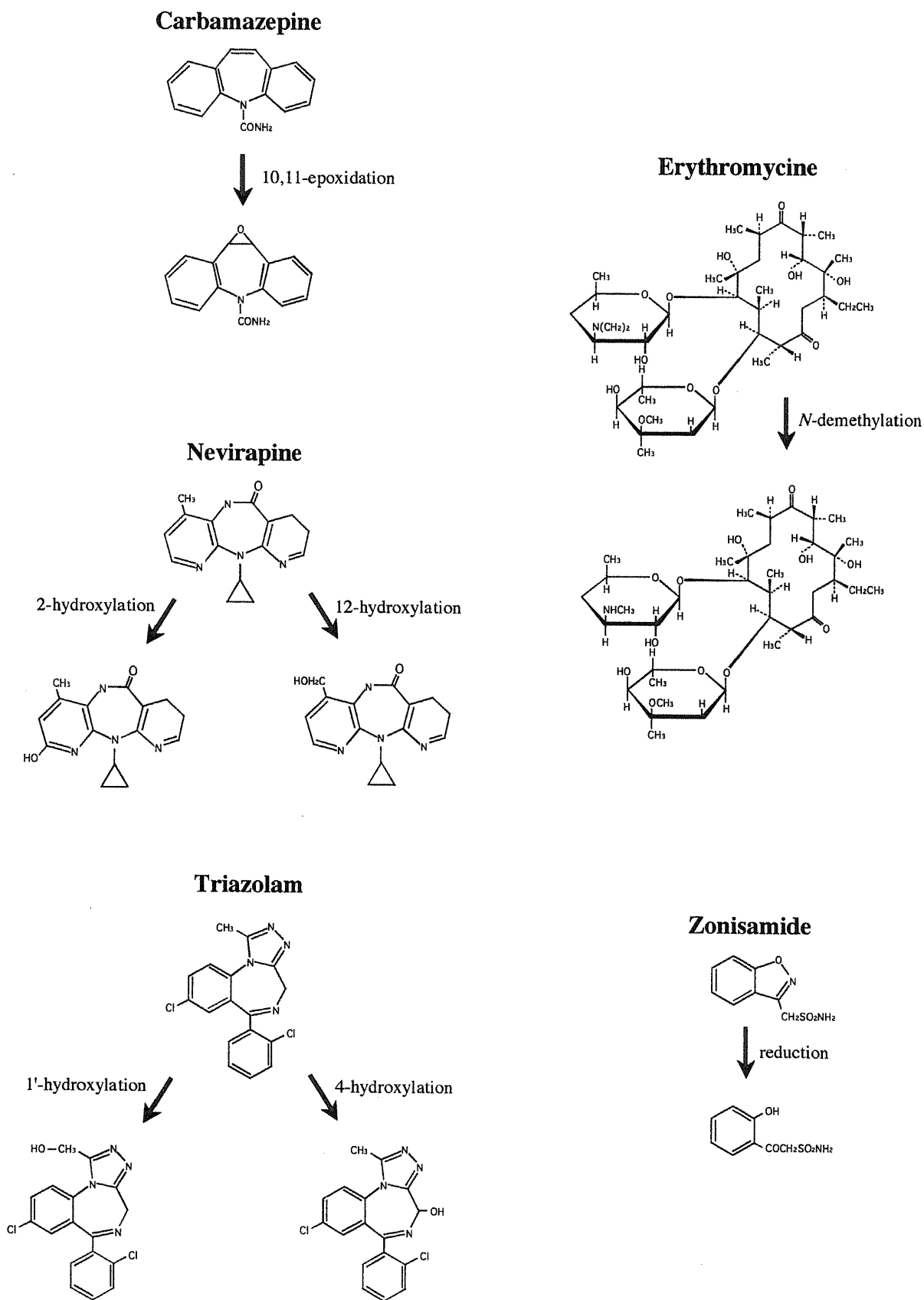
II-1-1-a	実験材料および試薬	28
2-1-1-b	各種内因性ステロイドを用いた添加実験	28
II-1-2	結果	30
II-1-2-a	内因性ステロイドの各種薬物代謝酵素活性に及ぼす影響	30
II-1-2-b	反応速度論的検討	35
<b>第2節 ヒト肝ミクロゾームによる検討</b>		40
II-2-1	実験方法	40
II-2-1-a	実験材料および試薬	40
II-2-1-b	代謝酵素活性測定法	40
II-2-1-c	各種内因性ステロイドを用いた添加実験	40
II-2-2	結果	41
II-2-2-a	内因性ステロイドの各種薬物代謝酵素活性に及ぼす影響	41
II-2-2-b	反応速度論的検討	43
<b>第3節 考察</b>		47
<b>第III章 分子力場計算と密度汎関数理論を用いた解析</b>		52
<b>第1節 発現 CYP3A4 における検討</b>		52
III-1-1	実験方法	52
III-1-1-a	CYP3A4のコンピューターモデリング法	52
III-1-1-b	モデルへの基質のフィッティング法	52
III-1-1-c	内因性ステロイドとCBZとの密度汎関数理論による量子化学計算	52
III-1-2	結果	52
<b>第2節 発現 CYP3A7 における検討</b>		56
III-2-1	実験方法	56
III-2-1-a	CYP3A7のコンピューターモデリング法	56
III-2-1-b	モデルへの基質のフィッティング	56
III-2-1-c	内因性ステロイドとカルバマゼピンの密度汎関数理論による量子化学計算	56
III-2-2	結果	56
<b>第3節 考察</b>		60

<b>第IV章</b>	<b>出生後の尿中ステロイド代謝物の変動</b>	62
<b>第1節</b>	<b>尿中 6<math>\beta</math>-水酸化コルチゾール/コルチゾール比 の出生後の変動</b>	62
IV-1-1	実験方法	62
IV-1-1-a	実験材料および試薬	62
IV-1-1-b	尿中 6 $\beta$ -水酸化コルチゾールの定量法	64
IV-1-1-c	尿中コルチゾールの定量法	64
IV-1-1-d	データ解析法	64
IV-1-2	結果	64
IV-1-2-a	出生時の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比	64
IV-1-2-b	出生後の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比の変動	65
<b>第2節</b>	<b>尿中 16<math>\alpha</math>-水酸化 DHEA/クレアチニン比の出生後の変動</b>	68
IV-2-1	実験方法	68
IV-2-1-a	実験材料および試薬	68
IV-2-1-b	尿中 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA の定量法	68
IV-2-1-c	尿中クレアチニンの定量法	68
IV-2-2	結果	68
<b>第3節</b>	<b>尿中ステロイド代謝物の出生後1年間の変動</b>	70
IV-3-1	実験方法	70
4-3-1-a	実験材料および試薬	70
4-3-1-b	尿中ステロイドおよびその代謝物の定量法	70
IV-3-2	結果	70
IV-3-2-a	出生後の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比の変動	
IV-3-2-b	出生後の尿中 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比の変動	70
<b>第4節</b>	<b>考察</b>	72
<b>総括</b>		75
<b>参考文献</b>		77

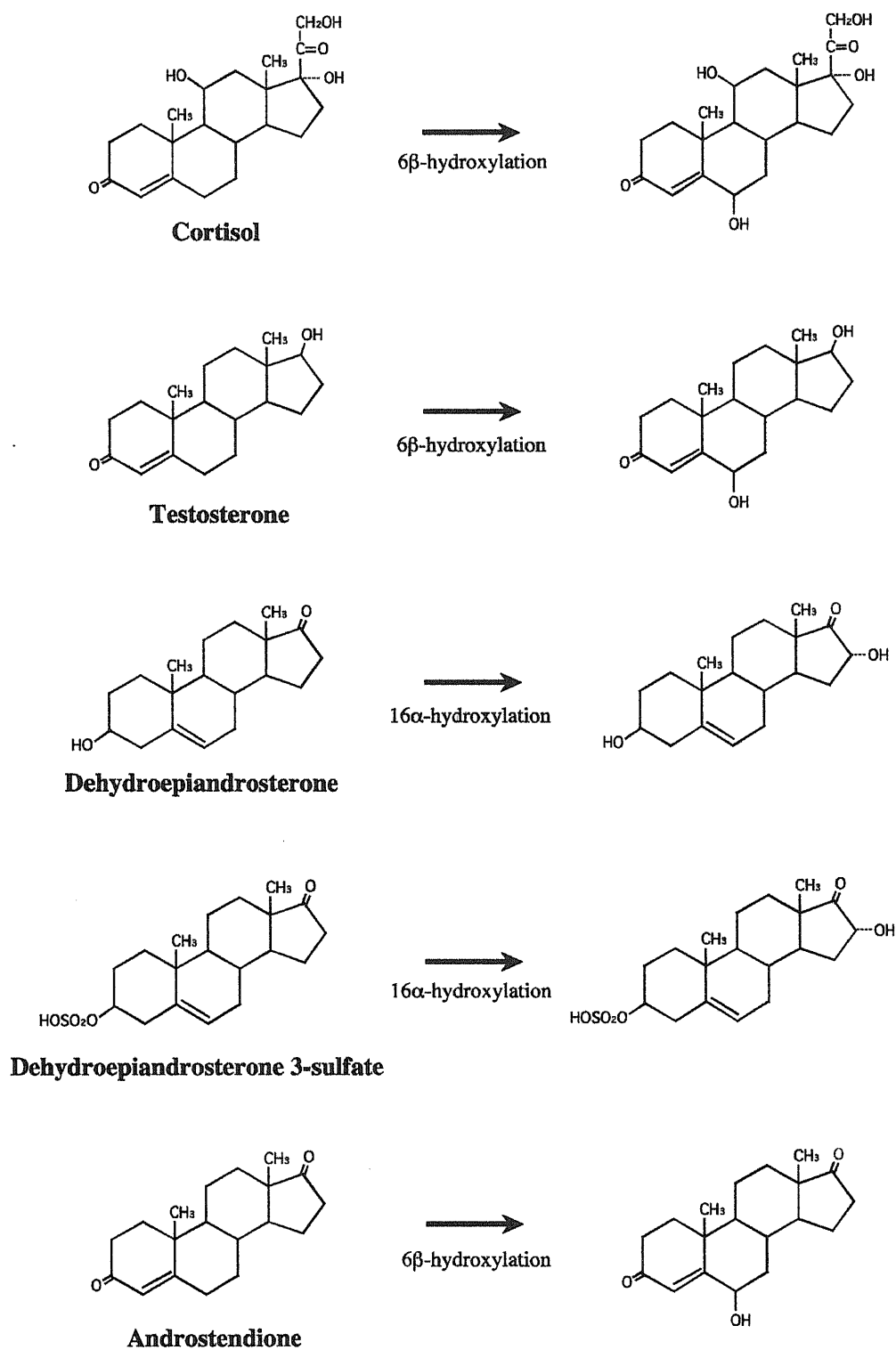
## 第 I 章 CYP3A4 と CYP3A7 の基質特異性の差異

CYP3A7 は胎児肝臓中で最大 50%を占める主要な酵素であることから、出生直後の新生児肝臓中には CYP3A7 が高含量存在していると考えられる。したがって、新生児期の薬物代謝能を考える上で CYP3A7 の薬物代謝酵素活性を明確にすることは重要である。しかしながら、これまでに CYP3A7 の薬物および内因性ステロイド代謝における基質特異性に関しては限られた報告しか存在せず (18-21)、加えて、報告により異なった発現系が用いられているために、直接活性の比較を行うことが困難であった。そこで、まず初めに CYP3A と CYP3A7 の各種薬物および内因性ステロイド代謝における基質特異性の差異について、バキュロウイルス-昆虫細胞系により発現させた両酵素を用い、*in vitro* の系にて検討を行った。基質として用いた薬物は、抗てんかん薬であるカルバマゼピン (CBZ)、ゾニサミド (ZNS)、抗 HIV 薬で非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬に分類されるネビラピン (NVP)、ベンゾジアゼピン系睡眠薬であるトリアゾラム (TZM)、マクロライド系抗生物質であるエリスロマイシン (EM) の 5 種類であり、これらの構造および反応を Fig. 1-1 に示した。また、内因性基質として用いた化合物はコルチゾール、テストステロン、デヒドロエピアンドロステロン (DHEA)、デヒドロエピアンドロステロン 3-硫酸 (DHEA-S)、アンドロステンジオンの 5 種類であり、これらの構造および反応を Fig. 1-2 に示した。

次に、CYP3A7 の基質特異性に影響を及ぼすアミノ酸残基を特定する目的で、CYP3A7 の活性部位と考えられるアミノ酸のうち CYP3A4 と異なる箇所を CYP3A4 のアミノ酸に置換した部位指向変異酵素 (N116S、H174D、N214D、K224T、K244E、K262E) の作成を行い、各種基質を用い代謝酵素活性の測定を行った。



**Fig. 1-1** The chemical structure and CYP3A-mediated metabolic pathways of drugs used in this study.



**Fig. 1-2** The chemical structure and CYP3A-mediated metabolic pathways of endogenous steroids used in this study.

## 第 1 節 CYP3A4 と CYP3A7 の各種薬物および内因性ステロイド代謝酵素活性の比較

### I-1-1 実験方法

#### I-1-1-a 実験材料および試薬

各種薬物および内因性ステロイド代謝における基質特異性に関する検討で用いた発現 CYP3A4 および CYP3A7 は GENTEST 社より購入したものを使用した。いずれも CYP 還元酵素との共発現でヒトチトクローム b5 を含有したものである。なお、本研究ではすべて同一ロット (CYP3A4; Lot. 48, CYP3A7; Lot. 7) を使用した。

CBZ およびその代謝物は Novartis Pharma 社より、NVP およびその代謝物は Boehringer Ingelheim 社より、TZM およびその代謝物は Upjhon 社より、ZNS およびその代謝物と *N,N*,ジメチルゾニサミドは大日本製薬社よりそれぞれご供与頂いたものを使用した。その他の試薬などはすべて特級または生化学用のものを使用した。

#### I-1-1-b カルバマゼピン 10,11-エポキシ化酵素活性測定法

発現 CYP3A4 および CYP3A7 における CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性の測定は以下に挙げる最終濃度、組成で 0.5 mL 容量にて行った。

- ミクロゾーム (CYP3A4, 15 pmol CYP/mL; CYP3A7, 30 pmol CYP/mL )
- 0.1 M Kpi (pH7.4)、0.1 mM EDTA、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP<sup>+</sup>、8 mM G-6-P、0.1 unit G-6-PDH、6 mM MgCl<sub>2</sub>)
- カルバマゼピン (基質)

反応は NADPH 生成系の添加により開始した。酵素反応は 37°C で CYP3A4 は 20 分間、CYP3A7 は 60 分間行い、抽出用溶媒であるクロロホルム : エタノール = 10 : 1 の割合で混合したものを 5 mL 加えることにより反応を停止した。反応停止後、内部標準物質 (10 μg/mL *N,N*,ジメチルゾニサミド / 抽出用溶媒溶液) 20 μL を加え 10 分間振倒混和し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上層を除去後、有機層を別の試験管に移し減圧下蒸発乾固した。残渣に分析用溶離液 100 μL を加え溶解したものを HPLC 用試料とし、40 μL を HPLC へ注入した。

HPLC システムは、L-6000 型ポンプ、L-4200 型 UV 検出器、AS-2000 型オートサンプラー、L-5000 型 LC コントローラー、D-2500 型クロマトインテグレーター (以上日立) を用いた。カラムは Puresil C18 (粒径 6 μm、4.6×150 mm、ミリポア)、プレカラム Inertsil ODS-2 (粒径 5 μm、4.6×50 mm、ジーエルサイエンス) を 35°C のカラム温度で使用した。

分析用溶離液として、水 : メタノール : アセトニトリル = 7 : 3 : 1 の割合で混合したものを脱気して用い、流速は 1.0 mL/分とした。カラムに残る物質を洗い流すために 15 分より溶離液を水 : メタノール : アセトニトリル = 5 : 3 : 5 の割合で混合したものに切り換え 15 分間カラムを洗浄した。その後分析用溶離液に戻し、さらに 20 分間カラムを洗浄、平衡化した。検出波長は 220 nm で行った。本条件にて、CBZ 10,11-エポキシ体は約 12 分、内部標準物質は約 15 分に溶出した。



#### I-1-1-c ネビラピン水酸化酵素活性測定法

発現 CYP3A4 および CYP3A7 における NVP 水酸化酵素活性の測定は以下に挙げる最終濃度、組成で 0.5 mL 容量にて行った。

- ミクロゾーム (CYP3A4, 30 pmol CYP/mL; CYP3A7, 40 pmol CYP/mL)
- 0.1 M Kpi (pH7.4)、0.1 mM EDTA、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP<sup>+</sup>、8 mM G-6-P、0.1 unit G-6-PDH、6 mM MgCl<sub>2</sub>)
- ネビラピン (基質)

反応は NADPH 生成系の添加により開始した。酵素反応は 37°C で CYP3A4 は 10 分間、CYP3A7 は 60 分間行い、酢酸エチル 5 mL を加えることにより反応を停止した。反応停止後、内部標準物質 (20 µg/mL フェノバルビタール/メタノール溶液) 20 µL を加え 10 分間振倒混和し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。酢酸エチル層を別の試験管に移し、減圧下蒸発乾固した。残渣にメタノール 100 µL を加え溶解したものを HPLC 用試料とし、40 µL を HPLC へ注入した。

HPLC システムは、CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性測定で用いたものと同様のシステムを用いた。カラムは、Inertsil ODS-80A (粒径 5 µm、4.6×250 mm、ジーエルサイエンス) を 35°C のカラム温度で使用した。

分析用溶離液として、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 4.0) : アセトニトリル : 2-プロパノール = 75 : 15 : 2 の割合で混合したものを脱気して用い、流速は 0.9 mL/分とした。カラムに残る物質を洗い流すために 25 分より溶離液を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 4.0) : アセトニトリル : 2-プロパノール = 50 : 50 : 2 の割合で混合したものに切り換え 15 分間カラムを洗浄した。その後分析用溶離液に戻し、さらに 20 分間カラムを洗浄、平衡化した。検出波長は 220 nm で行った。本条件にて、NVP 2-水酸化体は約 8 分、NVP 12-水酸化体は約 10 分、内部標準物質は約 26 分に溶出した。

#### I-1-1-d トリアゾラム水酸化酵素活性測定法

発現 CYP3A4 および CYP3A7 における TzM 水酸化酵素活性の測定は以下に挙げる最終濃度、組成で 0.5 mL 容量にて行った。

- ミクロゾーム (CYP3A4, 10 pmol CYP/mL; CYP3A7, 20 pmol CYP/mL)
- 0.1 M Kpi (pH7.4)、0.1 mM EDTA、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP<sup>+</sup>、8 mM G-6-P、0.1 unit G-6-PDH、6 mM MgCl<sub>2</sub>)
- トリアゾラム (基質)

反応は NADPH 生成系の添加により開始した。酵素反応は 37°C で CYP3A4 は 10 分間、CYP3A7 は 60 分間行い、酢酸エチル 5 mL を加えることにより反応を停止した。反応停止後、内部標準物質 (2.5 µg/mL ロラゼパム/メタノール溶液) 100 µL を加え、10 分間振倒混和し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離後、酢酸エチル層を別の試験管に移し、減圧下蒸発乾固した。残渣に分析用溶離液 120 µL を加え溶解したものを HPLC 用試料とし、40 µL を HPLC へ注入した。

HPLC システムは、CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性測定で用いたものと同様のシステ

ムを用いた。カラムは、Inertsil ODS-80A (粒径 5  $\mu\text{m}$ 、4.6 $\times$ 250 mm、ジーエルサイエンス) を 40 $^{\circ}\text{C}$  のカラム温度で使用した。

分析用溶離液として、水：アセトニトリル：メタノール = 7：3：1 の割合で混合したものを脱気して用い、流速は 1.0 mL/分とした。カラムに残る物質を洗い流すために 25 分より溶離液を水：アセトニトリル = 3：7 の割合で混合したものに切り換え 15 分間カラムを洗浄した。その後分析用溶離液に戻し、さらに 20 分間カラムを洗浄、平衡化した。検出波長は 220 nm で行った。本条件にて、TZM 1'-水酸化体は約 16.5 分、TZM 4-水酸化体は約 17.5 分、内部標準物質は約 22 分に溶出した。

#### I-1-1-e エリスロマイシン N-脱メチル化酵素活性測定法

発現 CYP3A4 および CYP3A7 における EM N-脱メチル化酵素活性の測定は以下に挙げる最終濃度、組成で 0.5 mL 容量にて行った。

- ミクロゾーム (CYP3A4, 20 pmol CYP/mL; CYP3A7, 40 pmol CYP/mL)
- 0.1 M Kpi (pH7.4)、0.1 mM EDTA、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP<sup>+</sup>、8 mM G-6-P、0.1 unit G-6-PDH、6 mM MgCl<sub>2</sub>)
- エリスロマイシン (基質)

エリスロマイシン N-脱メチル化酵素活性測定は、生成するホルムアルデヒドを Nash の方法 (27) にて定量することにより行った。

反応は NADPH 生成系の添加により開始した。酵素反応は 37 $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間行い、10% トリクロロ酢酸 1 mL を加えることにより反応を停止した。反応停止後、2,500 rpm で 10 分間遠心分離し、上層 1 mL を別の試験管に移し、Nash 試薬 2 mL を加え、37 $^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応を行った後、EX 410 nm、EM 510 nm にて蛍光光度を測定した。蛍光光度計は F-2000 型 (日立) を使用した。

#### I-1-1-f ゾニサミド還元酵素活性測定法

発現 CYP3A4 および CYP3A7 における ZNS 還元酵素活性の測定は以下に挙げる最終濃度、組成で 0.5 mL 容量にて行った。

- ミクロゾーム (CYP3A4, 20 pmol CYP/mL; CYP3A7, 40 pmol CYP/mL)
- 0.1 M Kpi (pH7.4)、0.1 mM EDTA、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP<sup>+</sup>、8 mM G-6-P、0.1 unit G-6-PDH、6 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 酸素消費系 (10 mM 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)
- ゾニサミド (基質)

ZNS 還元酵素活性の測定は嫌氣的条件下にて生成される 2-sulfamoyl-acetylphenol (SMAP) を定量することにより行った (28)。

反応は 37 $^{\circ}\text{C}$  で 3 分間プレインキュベーション後、NADPH 生成系を添加することにより開始した。酵素反応は 37 $^{\circ}\text{C}$  で CYP3A4、CYP3A7 とも 30 分間行い、酢酸エチル 5 mL を加えることにより反応を停止した。反応停止後、内部標準物質 (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  フェノバルピタール/メタノール溶液) 20  $\mu\text{L}$  を加え、10 分間振倒混和し、3,000 rpm で 10 分

間遠心分離後、酢酸エチル層を別の試験管に移し、減圧下蒸発乾固した。残渣にメタノール 100  $\mu$ l を加え溶解したものを HPLC 用試料とし、40  $\mu$ L を HPLC へ注入した。

HPLC システムは、CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性測定で用いたものと同様のシステムを用いた。HPLC 条件は検出波長を 260 nm で行った以外はすべて NVP 水酸化酵素活性測定条件と同様に行った。本条件にて、SMAP は約 10 分、内部標準物質は約 26 分に溶出した。

#### I-1-1-g テストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性測定法

発現 CYP3A4 および CYP3A7 におけるテストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性の測定は以下に挙げる最終濃度、組成で 0.5 mL 容量にて行った。

- ミクロゾーム (CYP3A4, 20 pmol CYP/mL; CYP3A7, 40 pmol CYP/mL)
- 0.1 M Kpi (pH7.4)、0.1 mM EDTA、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP<sup>+</sup>、8 mM G-6-P、0.1 unit G-6-PDH、6 mM MgCl<sub>2</sub>)
- テストステロン (基質)

反応は NADPH 生成系の添加により開始した。酵素反応は 37 $^{\circ}$ C で CYP3A4 は 10 分間、CYP3A7 は 60 分間行い、酢酸エチル 5 mL を加えることにより反応を停止した。反応停止後、内部標準物質 (100  $\mu$ M CBZ/メタノール溶液) 10  $\mu$ L を加え、10 分間振倒混和し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。酢酸エチル層 4 mL を別の試験管に移し、減圧下蒸発乾固した。残渣に分析用溶離液 100  $\mu$ L を加え溶解したものを HPLC 用試料とし、40  $\mu$ L を HPLC へ注入した。

HPLC システムは、CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性測定で用いたものと同様のシステムを用いた。カラムは Inertsil ODS-2 (粒径 5  $\mu$ m、4.6 $\times$ 150 mm、ジーエルサイエンス)、プレカラムとして Inertsil ODS-2 (粒径 5  $\mu$ m、4.6 $\times$ 50 mm、ジーエルサイエンス) を用い、45 $^{\circ}$ C のカラム温度で使用した。

分析用溶離液として、メタノール：アセトニトリル：水=50：4：46 の割合で混合したものを脱気して用い、流速は 0~15 分まで 0.7 mL/分とし、その後 15~25 分まで 1.2mL/分とし基質を溶出させた。検出波長は 236 nm で行った。本条件にてテストステロン 6 $\beta$ -水酸化体は約 8 分、内部標準物質は約 10 分に溶出した。

#### I-1-1-h コルチゾール 6 $\beta$ -水酸化酵素活性測定法

発現 CYP3A4 および CYP3A7 におけるコルチゾール 6 $\beta$ -水酸化酵素活性の測定は以下に挙げる最終濃度、組成で 0.5 mL 容量にて行った。

- ミクロゾーム (CYP3A4, 20 pmol CYP/mL; CYP3A7, 40 pmol CYP/mL)
- 0.1 M Kpi (pH7.4)、0.1 mM EDTA、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP<sup>+</sup>、8 mM G-6-P、0.1 unit G-6-PDH、6 mM MgCl<sub>2</sub>)
- コルチゾール (基質)

反応は NADPH 生成系の添加により開始した。酵素反応は 37 $^{\circ}$ C で CYP3A4 は 10 分間、CYP3A7 は 60 分間行い、酢酸エチル 5 mL を加えることにより反応を停止した。反応停止後、内部標準物質 (12.5  $\mu$ g/mL SMAP/メタノール溶液) 20  $\mu$ L を加え、10 分

間振倒混和し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。酢酸エチル層 4 mL を別の試験管に移し、減圧下蒸発乾固した。残渣に分析用溶離液 100  $\mu$ L を加え溶解したものを HPLC 用試料とし、40  $\mu$ L を HPLC へ注入した。

HPLC システムは、CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性測定で用いたものと同様のシステムを用いた。カラムは Inertsil ODS-2 (粒径 5  $\mu$ m、4.6 $\times$ 250 mm、ジーエルサイエンス)、プレカラムとして Inertsil ODS-2 (粒径 5  $\mu$ m、4.6 $\times$ 10 mm、ジーエルサイエンス) を用い、55 $^{\circ}$ C のカラム温度で使用した。

分析用溶離液として、エタノール : 5 mM TEAF 緩衝液 (pH 3.0) = 8 : 92 の割合で混合したものを脱気して用い、流速は 1.0 mL/分とした。カラムに残る物質を洗い流す目的で 20 分より溶離液をエタノール : 5 mM TEAF 緩衝液 (pH 3.0) = 4 : 6 の割合で混合したものに切り換え 15 分間カラムを洗浄した。その後分析用溶離液に戻し、さらに 20 分間カラムを洗浄、平衡化した。検出波長は 240 nm で行った。本条件にてコルチゾール 6 $\beta$ -水酸化体は約 16.5 分、内部標準物質は約 12 分に溶出した。

#### I-1-1-i デヒドロエピアンドロステロン 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性測定法

発現 CYP3A4 および CYP3A7 における DHEA 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性の測定は以下に挙げる最終濃度、組成で 0.5 mL 容量にて行った。

- ミクロゾーム (CYP3A4, 30 pmol CYP/mL; CYP3A7, 15 pmol CYP/mL)
- 0.1 M Kpi (pH7.4)、0.1 mM EDTA、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP<sup>+</sup>、8 mM G-6-P、0.1 unit G-6-PDH、6 mM MgCl<sub>2</sub>)
- デヒドロエピアンドロステロン (基質)

反応は NADPH 生成系の添加により開始した。酵素反応は 37 $^{\circ}$ C で CYP3A4 は 15 分間、CYP3A7 は 30 分間行い、2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.2) 1 mL を加え、氷冷することにより反応を停止した。反応停止後、内部標準物質 (100  $\mu$ M 11 $\beta$ -水酸化アンドロステロン/メタノール溶液) 100  $\mu$ L、酢酸エチル 5 mL を加え、10 分間振倒混和し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。酢酸エチル層 4 mL を別のスクリーキャップ試験管に移し、減圧下蒸発乾固した。残渣は Kawasaki らの方法 (29) により蛍光誘導体化を行った。すなわち、0.5% トリクロル酢酸/ベンゼン溶液 0.4 mL、0.5% ダンシルクロライド/エタノール溶液 0.2 mL を加え蓋をした後、70 $^{\circ}$ C の湯浴で 90 分間インキュベートした。その後、1.5% ピルビン酸/ベンゼン懸濁液 0.4 mL を加えさらに 70 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。反応液を減圧下蒸発乾固した後、0.2 M 水酸化ナトリウム 1 mL、ジクロロメタン 2 mL を加え、5 分間振倒混和し、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。水相を除去後、さらに 0.2 M 水酸化ナトリウム 1 mL を加え同様の操作を繰り返し、ジクロロメタン層を HPLC 用試料とし、20  $\mu$ L を HPLC へ注入した。

蛍光誘導体化した DHEA の 16 $\alpha$ -水酸化体は、蛍光検出器付きの HPLC にて測定した。HPLC システムは、L-7100 型ポンプ、L-7480 型蛍光検出器、L-7500 型クロマトインテグレーター (以上日立) を用いた。カラムは Inertsil SIL (粒径 5  $\mu$ m、4.6 $\times$ 250 mm、ジーエルサイエンス) を用い、室温で使用した。

分析用溶離液として、ジクロロメタン : エタノール = 100 : 1 の割合で混合したものを脱気して用い、流速は 1.0 mL/分とした。検出波長は EX : 330 nm、EM : 495 nm で行

った。本条件にて DHEA 16 $\alpha$ -水酸化体は約 17 分、内部標準物質は約 22 分に溶出した。

#### I-1-1-j デヒドロエピアンドロステロン 3-硫酸 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性測定法

発現 CYP3A4 および CYP3A7 における DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性の測定は以下に挙げる最終濃度、組成で 0.5 mL 容量にて行った。

- ミクロゾーム (CYP3A4, 40 pmol CYP/mL; CYP3A7, 20 pmol CYP/mL)
- 0.1 M Kpi (pH7.4)、0.1 mM EDTA、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP<sup>+</sup>、8 mM G-6-P、0.1 unit G-6-PDH、6 mM MgCl<sub>2</sub>)
- デヒドロエピアンドロステロン 3-硫酸 (基質)

酵素反応は DHEA 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性測定法と同様の条件にて行った。反応は 100 $^{\circ}$ C の湯浴で 10 分間加温することで停止した。冷後、2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.2) 1 mL およびスルファターゼ (500 unit) を加え、37 $^{\circ}$ C、24 時間脱硫酸抱合処理を行った。脱硫酸抱合処理後の操作、HPLC 条件は DHEA 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性測定法と同様に行った。

#### I-1-1-k アンドロステンジオン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性測定法

発現 CYP3A4 および CYP3A7 におけるアンドロステンジオン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性の測定は以下に挙げる最終濃度、組成で 0.5 mL 容量にて行った。

- ミクロゾーム (CYP3A4, 20 pmol CYP/mL; CYP3A7, 40 pmol CYP/mL)
- 0.1 M Kpi (pH7.4)、0.1 mM EDTA、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP<sup>+</sup>、8 mM G-6-P、0.1 unit G-6-PDH、6 mM MgCl<sub>2</sub>)
- アンドロステンジオン (基質)

反応は NADPH 生成系の添加により開始した。酵素反応は 37 $^{\circ}$ C で CYP3A4 は 5 分間、CYP3A7 は 15 分間行い、抽出用溶媒であるクロロホルム：エタノール=10：1 の割合に混合したものの 5 mL を加えることにより反応を停止した。反応停止後、内部標準物質 (10  $\mu$ g/mL *N,N*,ジメチルゾニサミド/抽出用溶媒溶液) 20  $\mu$ L を加え 10 分間振倒混和し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上層を除去後、有機層を別の試験管に移し減圧下蒸発乾固した。残渣に分析用溶離液 100  $\mu$ L を加え溶解したものを HPLC 用試料とし、40  $\mu$ L を HPLC へ注入した。

HPLC システムは、CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性測定で用いたものと同様のシステムを用いた。カラムは Inertsil ODS-3V (粒径 5  $\mu$ m、4.6 $\times$ 150 mm、ジーエルサイエンス) を使い、35 $^{\circ}$ C のカラム温度で使用した。

分析用溶離液として、水：メタノール：アセトニトリル=7：3：2 の割合で混合したものを脱気して使い、流速は 1.0 mL/分とした。カラムに残る物質を洗い流す目的で 20 分より溶離液を水：メタノール：アセトニトリル=3：3：5 の割合で混合したものに切り換え 20 分間カラムを洗浄した。その後分析用溶離液に戻し、さらに 20 分間カラムを洗浄、平衡化した。検出波長は 235 nm で行った。本条件にてアンドロステンジオン 6 $\beta$ -水酸化体は約 19 分、内部標準物質は約 13 分に溶出した。

なお、以上の薬物および内因性ステロイド代謝酵素活性測定における酵素量および反応時間は、すべて直線性の確認された範囲内である。

#### I-1-1-1 反応速度論的解析法

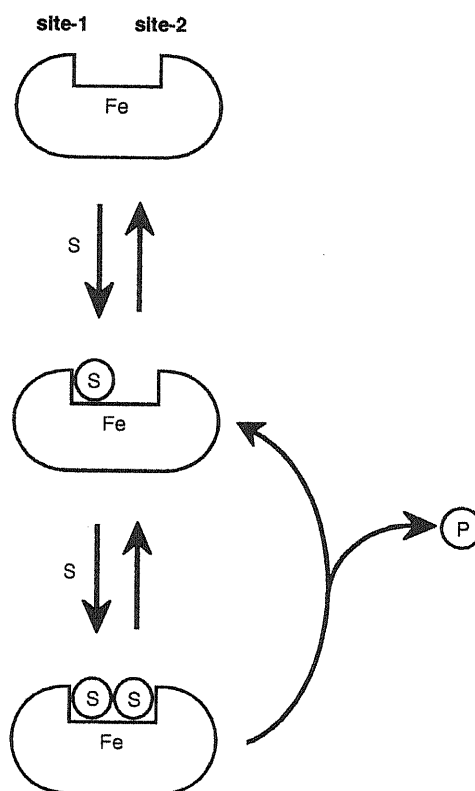
反応速度論パラメータは、Michaelis-Menten 式より  $K_m$  および  $V_{max}$  を算出した。なお、Eadie-Hofstee plot でシグモイド型の反応速度論曲線を示したものに関しては Eq. 1 に示した 2-binding site モデル (24) により解析を行った。

$$V = \left( \frac{V_{max2} S^2}{K_{m1} K_{m2}} \right) / \left[ 1 + \frac{S}{K_{m1}} + \frac{S^2}{K_{m1} K_{m2}} \right] \quad \text{Eq. 1}$$

本モデルでは、酵素 (E) と基質 (S) は酵素-基質 (ES) か ESS 複合体を形成することができ、ESS 複合体からのみ代謝物が生成するといった仮定によるものである (Fig. 1-3)。それ故、 $V_{max1}$  は 0 と設定されることとなる。

反応速度論パラメータは非線形最小自乗法ソフト Pro Fitt 5.5 (QuantumSoft, Zurich, Switzerland) を使い、Levenberg-Marquardt アルゴリズム (30) にて算出した。

なお、反応速度論的解析に際しての基質濃度は、CBZ および ZNS が 15、20、50、100、150、200、300、500  $\mu\text{M}$  にて、TZM は 15、20、50、100、150、200、300  $\mu\text{M}$  にて行った。



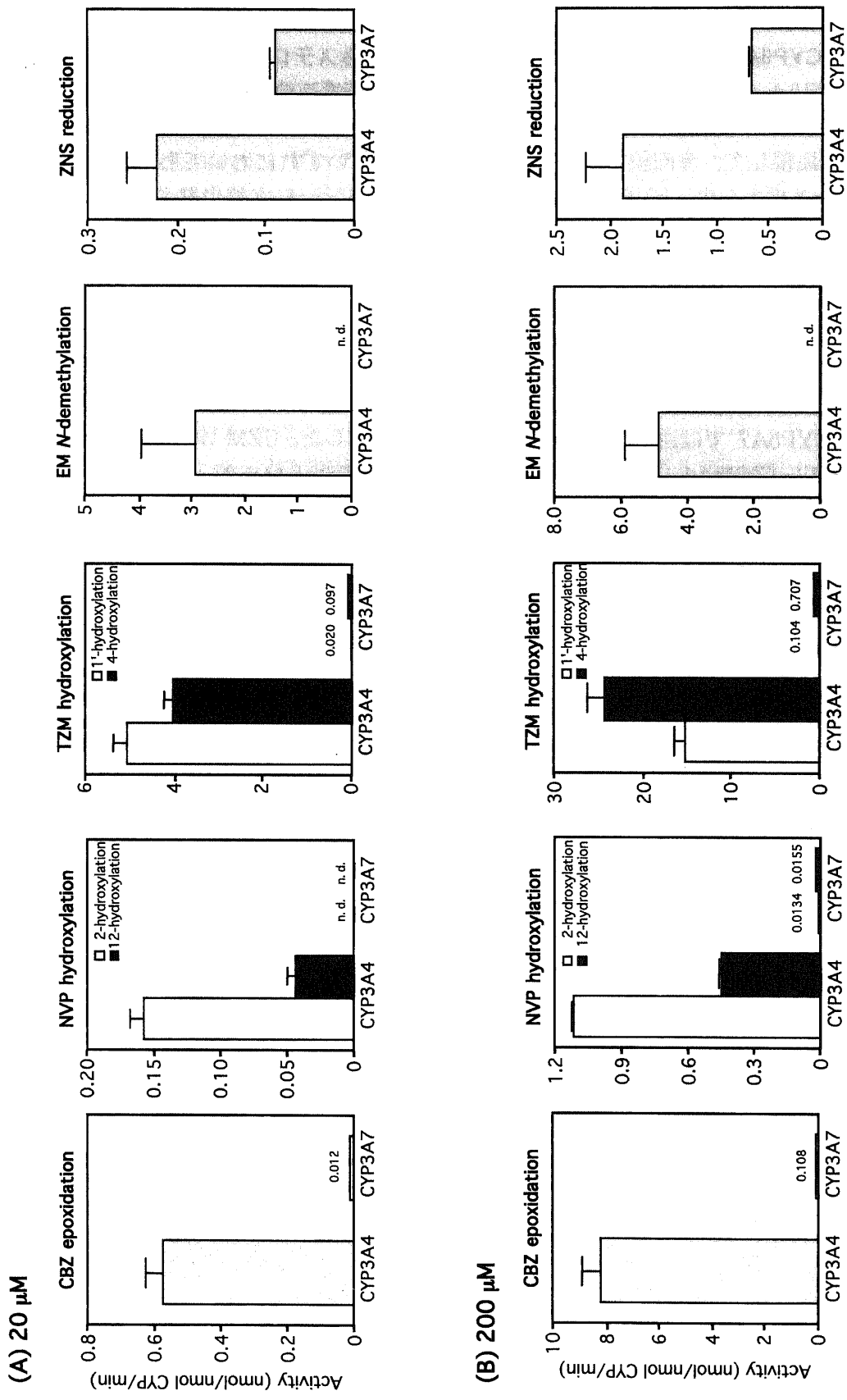
**Fig. 1-3 Proposed kinetic scheme with modified two binding sites within an active site.**  
(S, substrate; P, product)

## I-1-2 結果

### I-1-2-a CYP3A4 と CYP3A7 の各種薬物および内因性ステロイド代謝酵素活性の比較

発現 CYP3A4 および CYP3A7 による各種薬物代謝酵素活性を基質濃度 20  $\mu\text{M}$  および 200  $\mu\text{M}$  で比較した結果を Fig. 1-4 に示した。CYP3A7 による薬物代謝酵素活性は CYP3A4 と比較して、今回検討を行った 5 種類の薬物いずれにおいても低値を示した。CBZ 10,11-エポキシ化、NVP 2-, 12-水酸化、TZM 1'-, 4-水酸化および EM N-脱メチル化においては CYP3A7 の活性は、基質濃度 20  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$  ともすべて CYP3A4 の 1/30 以下であり、両者の薬物代謝酵素活性に大きな差が認められた。一方、CYP3A7 の ZNS 還元酵素活性は、基質濃度 20  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$  とともに CYP3A4 の 1/2 近くの活性を有していた。また、NVP と TZM の水酸化において、CYP3A4 と CYP3A7 で部位指向性の差異が認められた。NVP 水酸化は、基質濃度 20  $\mu\text{M}$  では CYP3A7 の活性が検出限界以下であったが、200  $\mu\text{M}$  において、CYP3A4 では 2-水酸化の方が 12-水酸化よりも高値であったが、CYP3A7 では逆に 12-水酸化の方が高値を示した。TZM 水酸化は基質濃度 20  $\mu\text{M}$  において、CYP3A4 では 1'-水酸化の方が 4-水酸化よりも若干高値であったが、CYP3A7 では逆に 4-水酸化の方が 1'-水酸化よりも約 5 倍高値を示した。200  $\mu\text{M}$  においては、CYP3A4、CYP3A7 とともに 4-水酸化の方が高値を示した。

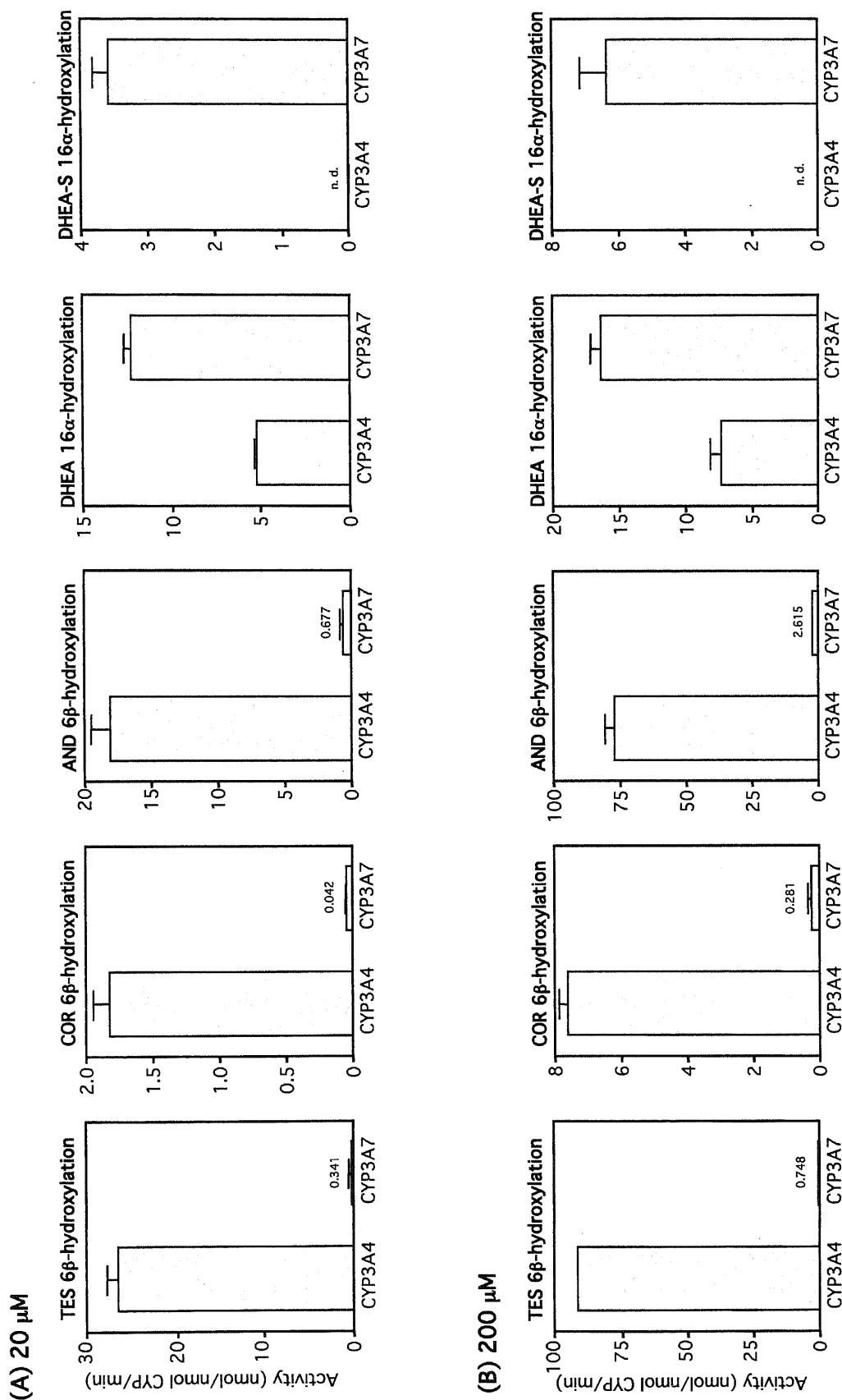
発現 CYP3A4 および CYP3A7 による各種内因性ステロイド代謝酵素活性を、基質濃度 20  $\mu\text{M}$  および 200  $\mu\text{M}$  で比較した結果をそれぞれ Fig. 1-5 に示した。CYP3A7 によるテストステロン、コルチゾールおよびアンドロステンジオン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性はいずれも CYP3A4 のそれと比較して低値をとり、CYP3A7 による活性は基質濃度 20  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$  ともすべて CYP3A4 の 1/25 以下であり、両者の代謝酵素活性には大きな差が認められた。一方、DHEA および DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性は CYP3A7 の方が CYP3A4 よりも高く、特に DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性は CYP3A7 においては高い活性を示したが、CYP3A4 にはほとんど活性が認められなかった。



**Fig. 1-4 Comparison of drug metabolic activities between expressed CYP3A4 and CYP3A7 at the concentration of 20  $\mu$ M (A) and 200  $\mu$ M (B)**

Data was shown as mean $\pm$ S.D. (n=3).





**Fig. 1-5 Comparison of endogenous steroid metabolic activities between expressed CYP3A4 and CYP3A7 at the concentration of 20  $\mu$ M (A) and 200  $\mu$ M (B)**

Data was shown as mean $\pm$ S.D. (n=3).

### I-1-2-b 反応速度論的検討

Table 1-1 に CYP3A4 と CYP3A7 の薬物および内因性ステロイド代謝における反応速度論パラメータを示した。CYP3A4 の CBZ エポキシ化、テストステロン 6β-水酸化、アンドロステンジオン 6β-水酸化は、反応速度論曲線がシグモイド型を呈したため、2-binding site モデルによりパラメータを算出した。一方、CYP3A7 においては、今回検討を行った基質に関してはすべて Michaelis-Menten 型であった。

**Table 1-1 Kinetic parameters of drugs and endogenous steroids metabolism by CYP3A4 and CYP3A7**

Reactions	Enzyme	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> (nmol/nmol CYP/min)	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> (mL/nmol CYP/min)
Carbamazepine epoxidation	CYP3A4	K <sub>m1</sub> = 104.8	V <sub>max2</sub> = 23.638 <sup>a</sup>	V <sub>max2</sub> /K <sub>m2</sub> = 0.09521
	CYP3A7	K <sub>m2</sub> = 248.3 <sup>a</sup> 720.9		
Triazolam 1'-hydroxylation	CYP3A4	102.2	22.641	0.22153
	CYP3A7	122.7	0.158	0.00129
Triazolam 4-hydroxylation	CYP3A4	594.5	95.482	0.16061
	CYP3A7	364.3	1.927	0.00529
Zonisamide reduction	CYP3A4	667.1	8.326	0.01248
	CYP3A7	451.7	2.129	0.00471
Testosterone 6β-hydroxylation	CYP3A4	K <sub>m1</sub> = 8.9	V <sub>max2</sub> = 112.678 <sup>a</sup>	V <sub>max2</sub> /K <sub>m2</sub> = 2.48194
	CYP3A7	K <sub>m2</sub> = 45.4 <sup>a</sup> 30.1		
Cortisol 6β-hydroxylation	CYP3A4	153.3	13.806	0.09006
	CYP3A7	230.1	0.048	0.00021
DHEA 16α-hydroxylation	CYP3A4	10.2	8.121	0.79618
	CYP3A7	7.5	17.386	2.31813
DHEA -S 16α-hydroxylation	CYP3A4	n.d.	n.d.	n.d.
	CYP3A7	17.0	6.604	0.38847
Androstendione 6β-hydroxylation	CYP3A4	K <sub>m1</sub> = 3.5	V <sub>max2</sub> = 117.493 <sup>a</sup>	V <sub>max2</sub> /K <sub>m2</sub> = 1.16905
	CYP3A7	K <sub>m2</sub> = 100.5 <sup>a</sup> 124.5		

Substrate concentration used were 5-500 μM.

<sup>a</sup>: Analyzed by the modified two-site equation (V<sub>max1</sub>=0).

$$V = (V_{max2} S^2 / K_{m1} K_{m2}) / (1 + S / K_{m1} + S^2 / K_{m1} K_{m2}) \quad (\text{Korezekwa et al., 1998})$$

両酵素間の薬物代謝における反応速度論パラメータの比較において、 $K_m$  は CBZ エポキシ化を除き、CYP3A4 と CYP3A7 で大差は認められなかったが、 $V_{max}$  は両酵素間で大きく異なり、CYP3A7 は CYP3A4 と比較して顕著に低値を示した。内因性ステロイド代謝においても薬物の場合と同様、 $K_m$  は CYP3A4 と CYP3A7 で極端な差は認められなかったが、 $V_{max}$  は両酵素間で大きく異なり、DHEA および DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性を除き著しく低値を示した。

## 第 2 節 部位指向変位導入酵素による検討

### I-2-1 実験方法

#### I-2-1-a 実験材料および試薬

本実験に用いた昆虫細胞 (Sf-9、TN-5) は、国立予防衛生研究所 松浦善治 博士より御恵与いただいた。組み換えバキュロウイルス作成に用いたトランスファーベクターは Invitrogen 社の p2Bac を、また、ウイルス DNA には PharMingen 社の BacuroGold を使用した。その他の試薬などはすべて特級または生化学用のものを使用した。

#### I-2-1-b CYP3A7 部位指向変異酵素の作成

部位指向変異酵素作成における変異導入は TaKaRa の「Mutan-Super Express Km」を使用し、CYP3A7 インサートを組み込んだベクター (CYP3A7/pKF18K) をテンプレートとし、Table 1-2 示したプライマーを用いた PCR 法により行った。変異酵素は、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて発現させた。

なお、部位指向変異酵素を用いた実験に際しては、野生型 CYP3A4 および CYP3A7 も同様の系にて発現させたものを使用し、酵素活性測定時の反応系には CYP 1 nmol に対して、Fp2 25 pmol、チトクローム b5 10 pmol を添加した。

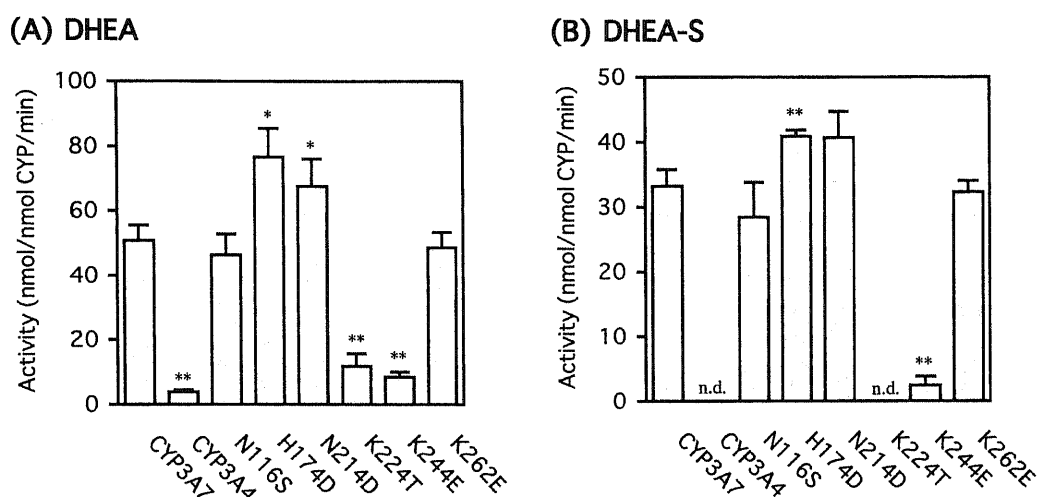
**Table 1-2 Primers used for amplification of CYP3A7 cDNA site-directed-mutagenesis (SDM).**

	3A7	3A4	5'	3'
N116S	Asn (N)	Ser (S)	TTATGAAA <u>AGT</u> GCCATCTC	
H174D	His (H)	Asp (D)	ACCTTGAAAGAC <u>GC</u> TCTTTG	
N214D	Asn (N)	Asp (D)	AGATTTGATCCATTAGATCC	
K224T	Lys (K)	Thr (T)	TCTCAATAA <u>CA</u> GTCCTTCC	
K244E	Lys (K)	Glu (E)	TTCCAAGAGAAGTTATAAG	
K262E	Lys (K)	Glu (E)	GGTCGCCTCGAAGAGACAC	

The oligonucleotides which were used to introduce the different substitutions are shown with the specific change underlined.

### I-2-2 結果

Fig. 1-6 に CYP3A7 とその部位指向変位酵素および CYP3A4 による DHEA および DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性を示した。各種部位指向変異酵素の DHEA 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性を野生型 CYP3A7 の活性と比較したところ、K244E は 17%、K224T は 23%と有意に低値を示した。一方、H174D、N214D は CYP3A7 の活性と比較して、それぞれ 151%、133%と有意に高値を示した。DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性においては、K224T で消失し、K244E では野生型 CYP3A7 の活性の 8%と有意に低値を示した。また、H174D は 123%と有意に高値を示した。



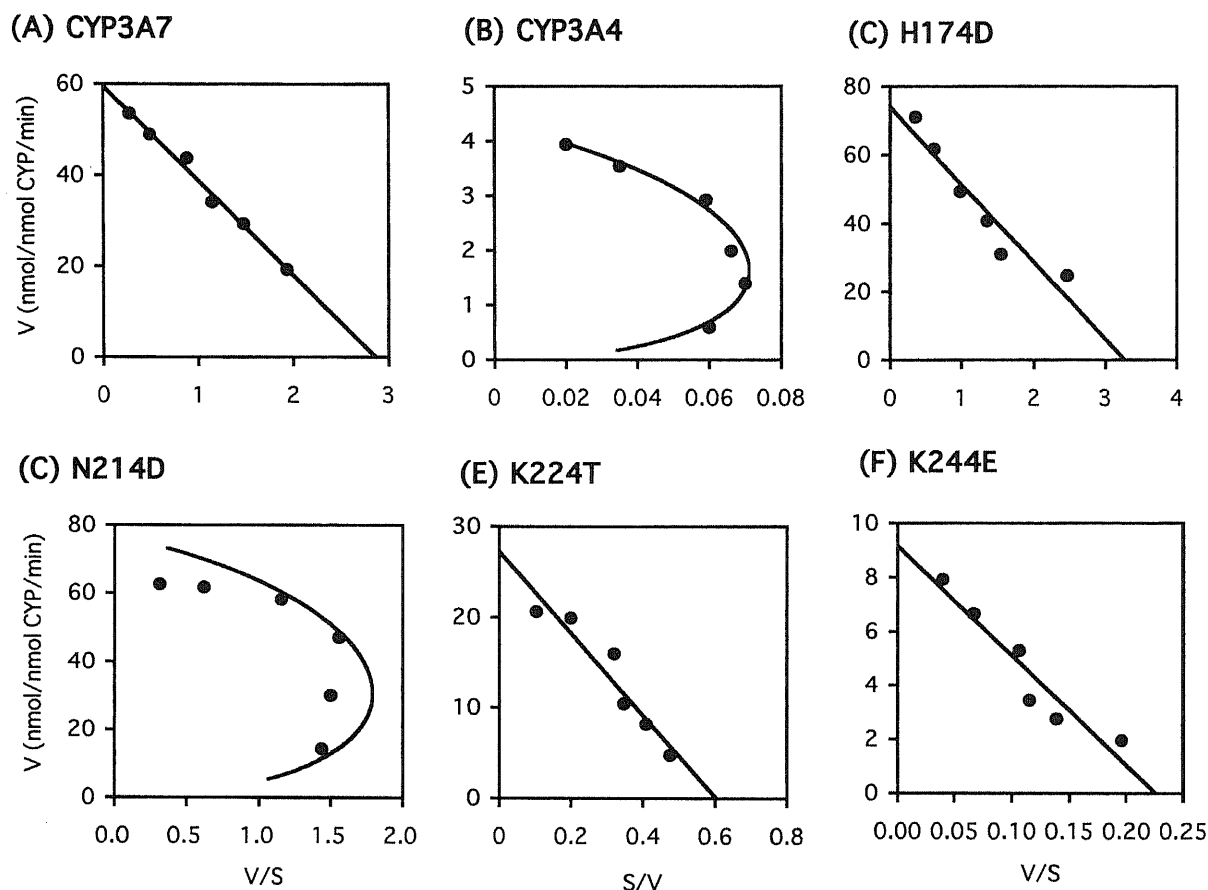
**Fig. 1-6 Comparison of DHEA (A) and DHEA-S (B) 16 $\alpha$ -hydroxylation activities between CYP3A4, CYP3A7 and SDMs.**

The concentration of DHEA (A) and DHEA-S (B) was 100  $\mu$ M. Data was shown as mean $\pm$ S.D. (n=3).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with CYP3A7.

次に、DHEA 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性に関し、野生型 CYP3A7 の活性と比較して有意差の認められた部位指向変異酵素 H174D、N214D、K224T および K244E と、野生型 CYP3A7、CYP3A4 の各酵素を用い、反応速度論的解析を行った。Fig. 1-7 に野生型 CYP3A7、CYP3A4 および各種部位指向変異酵素の Eadie-Hofstee plot を、また、Table 1-3 にその反応速度論パラメータを示した。CYP3A4 および N214D においては、その反応速度論曲線はシグモイド型を示したが、野生型 CYP3A7 および H174D、K224T、K244E においては Michaelis-Menten 型の反応速度論曲線を示した。DHEA 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性における  $K_m$  値は、Fig. 1-6 で有意な活性低下がみられた K224T、K244E ではそれぞれ、野生型 CYP3A7 の約 2 倍、2.5 倍に増加し、 $V_{max}$  は顕著に減少していた。また、 $V_{max}/K_m$  は CYP3A7 を 1 とすると、H174D は 0.94、K224T は 0.23、K244E は 0.07 で、K224T、K244E では代謝効率が顕著に低下した。

Fig. 1-8 に、CYP3A7 とその部位指向変異酵素および CYP3A4 による CBZ 10,11-エポキシ化、NVP 2-, 12-水酸化、TZM 1'-, 4-水酸化、EM *N*-脱メチル化およびテストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性を示した。いずれの反応においても、CYP3A4 の活性と比較して、野生型 CYP3A7 および各種部位指向性変異酵素の活性は低値を示し、特に K224T、K244E の活性は低かった。



**Fig. 1-7 Eadie-Hofstee plots of DHEA 16 $\alpha$ -hydroxylation by CYP3A7 (A), CYP3A4(B), H174D (C), N214D (D), K224T (E) and K244E (F).**

Lines were drawn using data analyzed by the modified two-site equation for CYP3A4 and N214D, and by Michaelis-Menten equation for CYP3A7, H174D, K224T, K244E.

Substrate concentrations used were varied from 10 to 200  $\mu$ M.

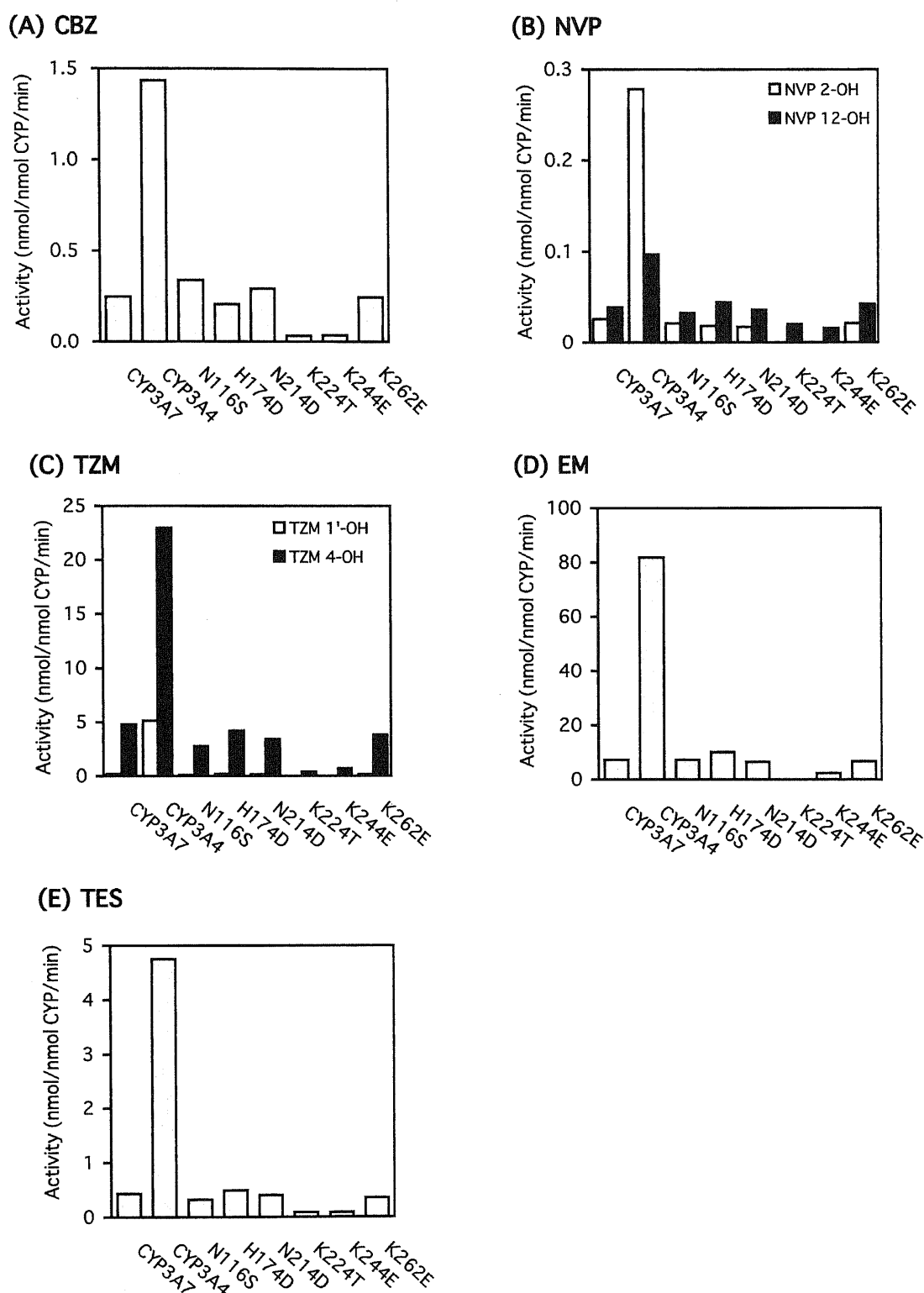
**Table 1-3 Kinetic parameters of DHEA 16 $\alpha$ -hydroxylation by CYP3A4, CYP3A7 and CYP3A7 SDMs**

CYP	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (nmol/nmol CYP/min)	$V_{max}/K_m$ (mL/nmol CYP/min)
CYP3A7	20.5	59.3	2.89
CYP3A4	$K_{m1}=36.7$ $K_{m2}=14.4^a$	4.3	$V_{max2}/K_{m1}=0.12$
H174D	28.0	80.0	2.73
N214D	$K_{m1}=33.6$ $K_{m2}=8.7^a$	76.9	$V_{max2}/K_{m1}=2.29$
K224T	39.2	26.0	0.66
K244E	48.6	9.9	0.20

Substrate concentrations used were 12.5-200  $\mu$ M.

*a*: Analyzed by the modified two-site equation ( $V_{max1}=0$ ).

$$V = (V_{max2} S^2 / K_{m1} K_{m2}) / (1 + S / K_{m1} + S^2 / K_{m1} K_{m2}) \quad (\text{Korezekwa et al., 1998})$$



**Fig. 1-8 Comparison of metabolic activities between CYP3A4, CYP3A7 and SDMs at the concentration of 100  $\mu$ M.**

(A), CBZ 10,11-epoxidation; (B), NVP 2-, 12-hydroxylation; (C), TZM 1', 4-hydroxylation; (D), EM N-demethylation; (E) TES 6 $\beta$ -hydroxylation.

### 第3節 考察

CYP3A4 と CYP3A7 の基質特異性に関しては、これまでに断片的な検討は行われているものの、報告により異なった発現系が用いられているため、直接活性の比較を行うことが困難であった。今回、両酵素の基質特異性を明確にするために、バキュロウイルス-昆虫細胞系により CYP 還元酵素と共発現させた CYP3A4 と CYP3A7 を用いて、各種薬物および内因性ステロイドの代謝酵素活性を比較した。その結果、今回検討を行った基質の中で CYP3A7 による代謝酵素活性が CYP3A4 を上回ったものは DHEA および DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性のみで、他の基質においてはすべて CYP3A7 による代謝酵素活性は CYP3A4 によるそれを下回った。ただし、CYP3A4 と CYP3A7 の代謝酵素活性の差は基質によって大きく異なっていた。また、NVP および TZM 水酸化において部位指向性の差異が認められたことから、活性部位内部における基質の配置は両酵素間で差があることが示唆された。

反応速度論パラメータの比較では、 $K_m$  は薬物、内因性ステロイドとも CYP3A4 と CYP3A7 で大差は認められなかったが、 $V_{max}$  は両酵素間で大きく異なり、CYP3A7 は CYP3A4 と比較して DHEA および DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性を除き著しく低値を示した。以上の結果は、CYP3A4 と CYP3A7 は少なくとも今回検討を行った基質に関しては、酵素との親和性に関しては両者で大差ないものの、最大代謝酵素活性に大きな差があることを意味している。この様に、最大代謝酵素活性が CYP3A4 と CYP3A7 で異なる理由として、両酵素の代謝物に対する親和性の差異が考えられた。すなわち、CYP3A7 では代謝物が代謝部位に留まり易く、CYP の反応サイクルが CYP3A4 よりも遅い可能性が考えられた。一方、CYP3A7 の活性部位と考えられるアミノ酸のうち CYP3A4 と異なる箇所を CYP3A4 のアミノ酸に置換した変異酵素 (N116S, H174D, N214D, K262E) はそのいずれもが DHEA および DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性の低下を来さなかったのに対し、活性部位への入り口付近に位置すると考えられる相違アミノ酸を置換した変異酵素 (K224T, K244E) では、DHEA および DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性が著しく低下し、CYP3A4 の活性に近づいた。CYP3A7 の DHEA および DHEA-S に対する 16 $\alpha$ -水酸化機能には、224 番目および 244 番目のリジンが重要である可能性が示唆された。この様に、酵素の活性部位内部の違いのみならず、活性部位への出入り口のアミノ酸の相違が両酵素の最大代謝酵素活性の差を生じさせている可能性が考えられた。しかし、これらの変異酵素を用いた CBZ 10,11-エポキシ化、NVP 2-, 12-水酸化、TZM 1'-, 4-水酸化、EM *N*-脱メチル化およびテストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性の測定において、K224T, K244E は CYP3A7 の活性を上回ることではなく、むしろ逆に低値を示したことから、K224T, K244E も CYP3A4 としての基質特異性は獲得していないと考えられた。すなわち、今回検討したアミノ酸残基に関しては、CYP3A7 のアミノ酸をその位置に対応する CYP3A4 のアミノ酸に一カ所変異させただけでは、酵素の基質特異性が CYP3A7 型から CYP3A4 型に変化するわけではないことが示された。これらの結果より、CYP3A7 の酵素学的特性を規定しているアミノ酸残基は1つではないという可能性が考えられた。

今回検討を行った一部の基質においては、CYP3A4 による代謝反応の反応速度論曲線はシグモイド型を示した。非 Michaelis-Menten 型の kinetic パターンを示す反応速度論的解析法として、Korzekwa らは 2-binding site モデルを提唱している (24)。本モデ



ルは CYP の活性部位に 2 つの基質が同時に存在でき、そのいずれからも活性化酸素にアクセスできるといったもので、代謝生成物の解離が速いと仮定するとその速度式は Eq. 2 となる。

$$V = \left[ \frac{V_{\max 1} S}{K_{m1}} + \frac{V_{\max 2} S^2}{K_{m1} K_{m2}} \right] / \left[ 1 + \frac{S}{K_{m1}} + \frac{S^2}{K_{m1} K_{m2}} \right] \quad \text{Eq. 2}$$

しかし、Eq. 2 による解析では、非線形最小自乗法で計算する際の初期値の取り方や実験誤差等により、唯一の解答を得ることが困難であり、たとえば CYP3A4 による CBZ 10,11-エポキシ化において Korzekwa らは  $V_{\max 1}$  が  $V_{\max 2}$  に比べ非常に小さい値をとることから、 $V_{\max 1}=0$  とした Eq. 1 (P 16) による解析も行っている。また、Domanski らもプロゲステロンの 6 $\beta$ -水酸化の速度論的解析に際し、同様の理由から Eq. 1 を採用している (23)。そこで今回の検討では、非 Michaelis-Menten 型の kinetic パターンを示した反応の解析は Eq. 1 を用いて行った。本モデルにおいては、 $K_{m1}$  あるいは  $K_{m2}$  のいずれかが十分に小さい場合は一方の site の存在は無視することが可能となり、その反応曲線は Michaelis-Menten 型に近似することになる。これまで当研究室での検討結果より、CYP3A7 の活性部位は CYP3A4 と同様かなり広く、複数の基質を収容することが可能と考えられるが、CYP3A7 は今回検討を行った基質においてはすべて Michaelis-Menten 型を示した。よって、CYP3A7 は今回検討を行った基質に関しては活性部位内の単一の部位でしか相互作用を起こさない、あるいはこれら基質の site-1 へのアフィニティーが極めて大きいため見かけ上 Michaelis-Menten 型を示す可能性が考えられた。CYP3A7 の部位指向変異酵素を用いた検討において、CYP3A7 の活性部位内部に存在すると考えられる 214 番のアスパラギンをアスパラギン酸に変異させた N214D は、DHEA 16 $\alpha$ -水酸化の反応速度論曲線が Michaelis-Menten 型から CYP3A4 のようにシグモイド型に変化した。CYP3A7 の 214 番のアスパラギンは、活性部位内部の構造に何らかの寄与をし、CYP3A4 と CYP3A7 の kinetic パターンの相違に影響を与えていることが示唆された。

また、今回検討を行った基質で CYP3A7 による代謝酵素活性が CYP3A4 を上まわったのは DHEA および DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性のみであったが、最近の報告で CYP3A7 は高いレチノイン酸の 4-水酸化酵素活性をもち、CYP3A4 を含む各種 CYP 分子種で比較した場合、突出してその活性が高いことが報告されている (31,32)。レチノイン酸は形態形成物質の本体として注目されているもので、特に発生分化の際の形態形成にレチノイン酸の濃度勾配が方向を定めるとされている。CYP3A7 は、胎児期に高濃度に存在し胎児の発育、妊娠の維持に重要な役割を演じている DHEA-S や発生分化の際の形態形成に重要なレチノイン酸の代謝にも関与していることから、形態形成期において極めて重要な役割を担っている酵素と考えられる。

## 第Ⅱ章 内因性ステロイドの CYP3A 活性に及ぼす影響

新生児期は成人とは大きく異なる内因性ステロイドの分泌パターンを示し、CYP3A はこれら内因性ステロイドの代謝にも関与する。新生児期の薬物代謝能を考える上で、CYP3A4 および CYP3A7 による薬物代謝酵素活性に及ぼす内因性ステロイドの影響を明らかにする必要があると考え、各種内因性ステロイドが両酵素の触媒する薬物代謝に対し如何なる影響を及ぼすかについて *in vitro* 系にて検討を行った。

### 第 1 節 発現酵素による検討

#### Ⅱ-1-1 実験方法

##### Ⅱ-1-1-a 実験材料および試薬

プレグネノロン、プレグネノロン-S、プロゲステロン、アルドステロン、コルチゾール、DHEA、DHEA-S、アンドロステンジオン、エストロン、エストラジオールはシグマ社より、17 $\alpha$ -水酸化プレグネノロン、17 $\alpha$ -水酸化プレグネノロン-S、17 $\alpha$ -水酸化プロゲステロンはステラロイド社より、テストステロンは第一化学薬品より購入したものを使用した。これら、14 種類の内因性ステロイドの構造式を Fig. 2-1 に示した。なお、その他の試薬類はすべて特級または生化学用のものを使用した。

##### Ⅱ-1-1-b 各種内因性ステロイドを用いた添加実験

発現 CYP3A4 と CYP3A7 による薬物代謝酵素活性に及ぼす各種内因性ステロイドの影響について検討を行う目的で Fig. 2-1 に示した 14 種類の内因性ステロイドを反応系に添加し、代謝酵素活性の変化を測定した。また、CYP3A4 の触媒反応を活性化することが知られている $\alpha$ -ナフトフラボン添加の影響についても同時に検討を行った。なお、検討を行った薬物代謝反応は第 I 章と同様の CBZ 10,11-エポキシ化、NVP 2-, 12-水酸化、TZM 1'-, 4-水酸化、EM N-脱メチル化および ZNS 還元反応であり、代謝酵素活性の測定も第 I 章と同様の方法で行った。薬物、各種内因性ステロイド、 $\alpha$ -ナフトフラボンはすべて 100  $\mu$ M となるように反応系に添加した。

また、発現 CYP3A4 および CYP3A7 による CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性に及ぼす内因性ステロイド添加濃度の影響について検討を行った。アルドステロン、DHEA-S、アンドロステンジオンおよびエストラジオールを 25、50、100、200  $\mu$ M となるように反応系に添加し、CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性の変化を測定した。なお、CBZ の濃度は 100  $\mu$ M にて行った。

内因性ステロイド添加による活性変化についてさらに詳細に検討する目的で、発現 CYP3A4 および CYP3A7 による CBZ 10,11-エポキシ化の反応速度論曲線が、それぞれアンドロステンジオンおよび DHEA-S の添加により如何に変化するか検討を行った。CBZ 10,11-エポキシ化の反応速度論解析における基質濃度は 15、20、50、100、150、200、300、500  $\mu$ M の 8 ポイントで行い、内因性ステロイドは 100  $\mu$ M となるように反応系に添加した。また、CBZ の添加が、CYP3A4 によるアンドロステンジオン 6 $\beta$ -水酸

化および CYP3A7 による DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化の反応速度論曲線に如何なる影響を及ぼすかについても検討を行った。アンドロステンジオン 6 $\beta$ -水酸化の反応速度論解析における基質濃度は 5、10、15、20、50、100、150、200、300、500  $\mu$ M の 10 ポイント、DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化の反応速度論解析における基質濃度は 10、15、20、50、100、150、200、300、500  $\mu$ M の 9 ポイントで行い、CBZ は 100  $\mu$ M となるように反応系に添加した。

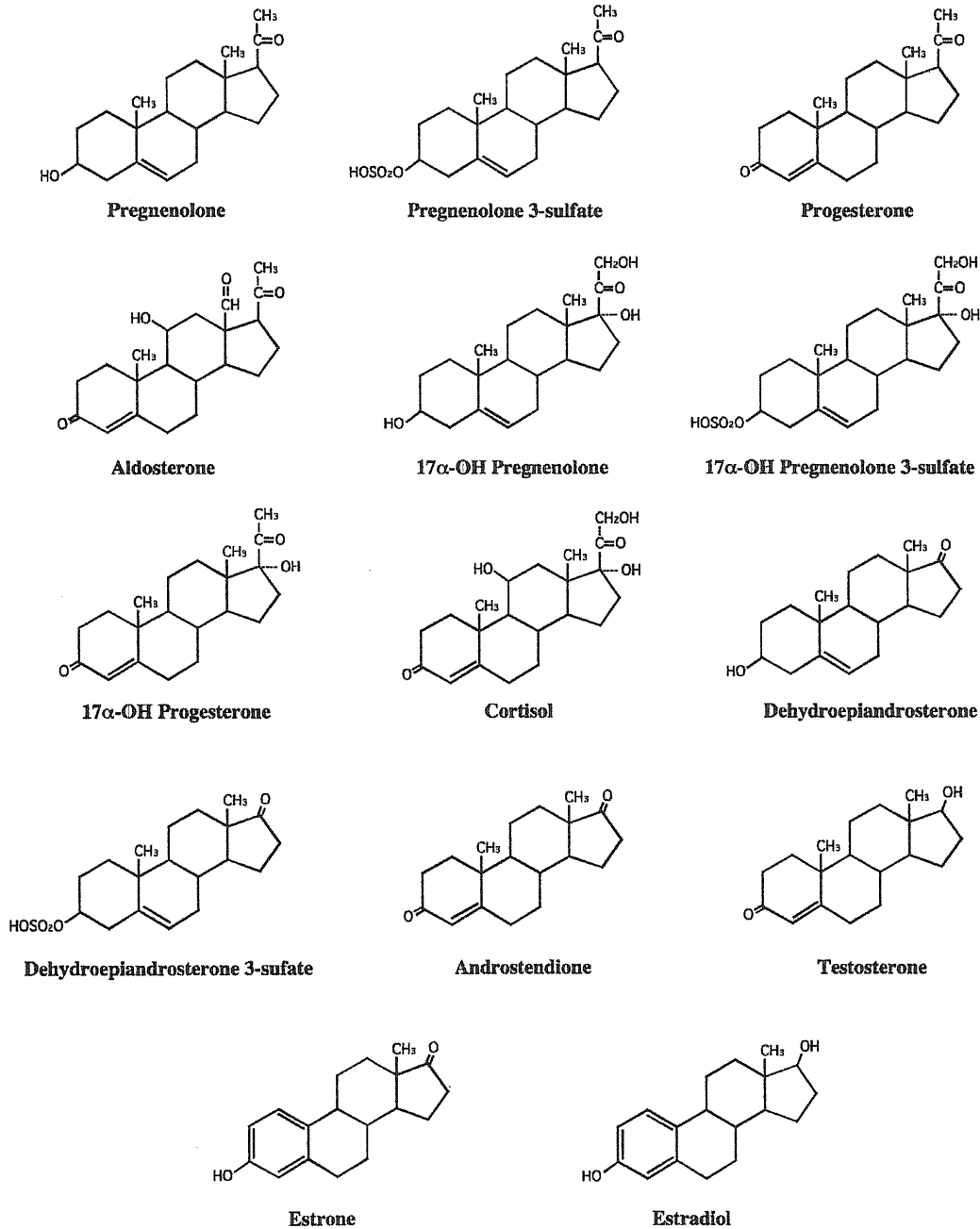


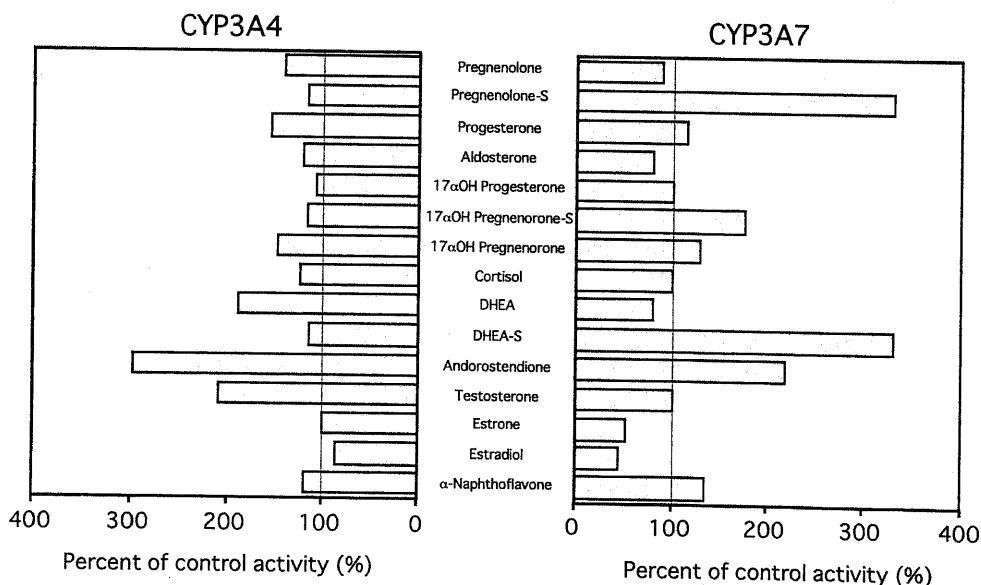
Fig. 2-1 The chemical structure of endogenous steroids used in this study.

## II-1-2 結果

### II-1-2-a 内因性ステロイドの各種薬物代謝酵素活性に及ぼす影響

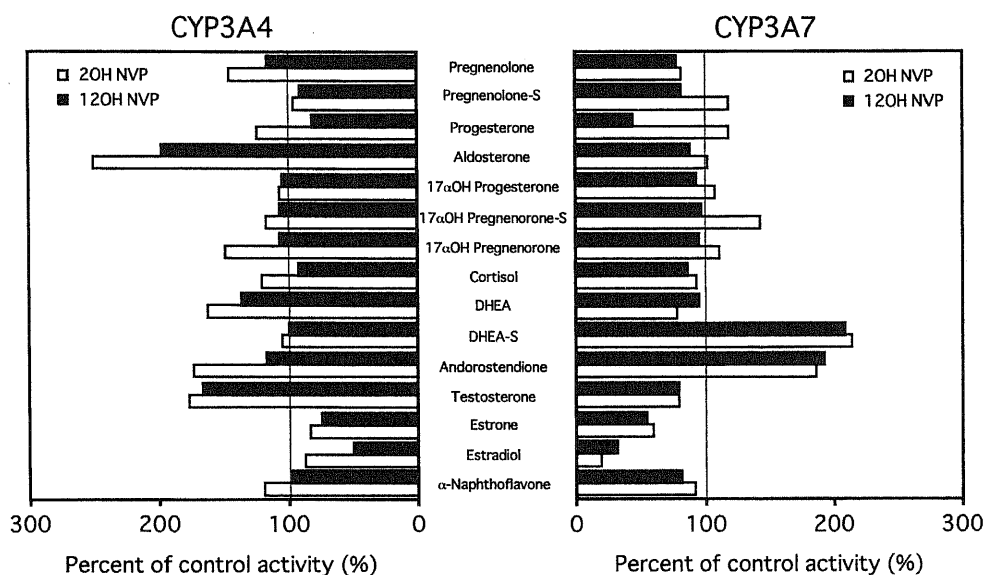
Fig. 2-2 に CYP3A4 および CYP3A7 の CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性に及ぼす各種内因性ステロイドおよび $\alpha$ -ナフトフラボン添加の影響を示した。CYP3A4 においては、DHEA、アンドロステンジオン、テストステロンといったアンドロゲン添加により CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性がコントロール活性と比較して 1.5 倍以上に上昇した。特にアンドロステンジオンによる活性上昇は顕著で、コントロールと比較して約 3 倍に上昇した。一方、CYP3A7 においては、プレグネノロン-S、 $17\alpha$ -水酸化プレグネノロン-S、DHEA-S といった 3 位の硫酸抱合ステロイドとアンドロステンジオン添加により、CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性はコントロールと比較して 1.5 倍以上に上昇した。特にプレグネノロン-S と DHEA-S による活性上昇は顕著でコントロール活性と比較して 3 倍以上に上昇した。

Fig. 2-3 に CYP3A4 および CYP3A7 の NVP 2-, 12-水酸化酵素活性に及ぼす各種内因性ステロイドおよび $\alpha$ -ナフトフラボン添加の影響を示した。CYP3A4 においては、2-水酸化酵素活性を 1.5 倍以上上昇させたのはアルドステロンとテストステロンで、12-水酸化酵素活性を 1.5 倍以上上昇させたのは DHEA、アンドロステンジオン、テストステロンといったアンドロゲンとアルドステロンであった。また、エストロン、エストラジオールといったエストロゲンによりいずれの水酸化反応も阻害を受けた。一方、CYP3A7 においては、両水酸化を 1.5 倍以上活性化したのは DHEA-S およびアンドロステンジオンであった。また、CYP3A4 と同様エストロン、エストラジオールといったエストロゲンによりいずれの水酸化反応も阻害を受けた。



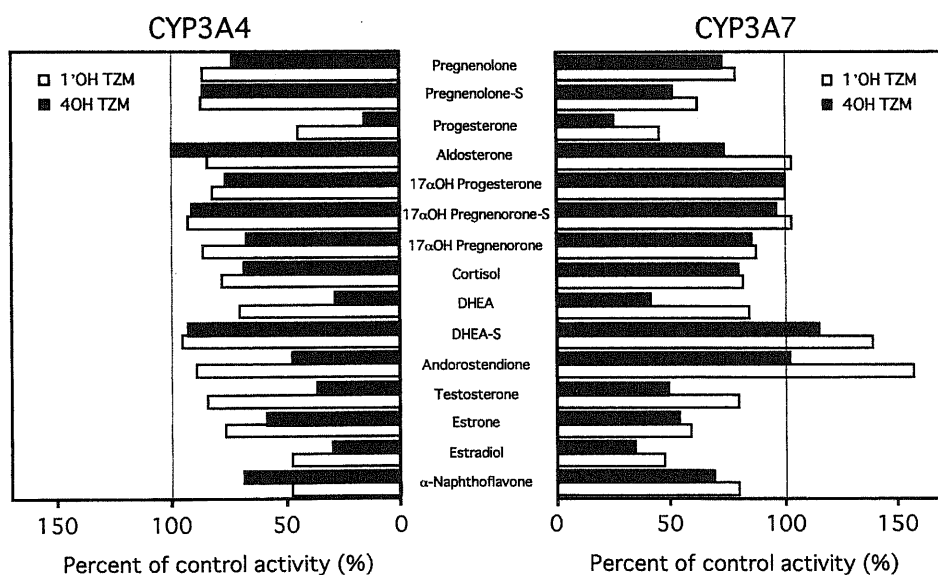
**Fig. 2-2 Effects of endogenous steroids and  $\alpha$ -naphthoflavone on CBZ 10,11-epoxidation by expressed CYP3A4 (A) and CYP3A7 (B).**

The concentration of endogenous steroids,  $\alpha$ -naphthoflavone, and CBZ was 100  $\mu$ M. Basal activities of CYP3A4 and CYP3A7 were 3.36 and 0.08 nmol/nmol CYP/min, respectively.



**Fig. 2-3 Effects of endogenous steroids and  $\alpha$ -naphthoflavone on NVP 2- and 12-hydroxylation by expressed CYP3A4 (A) and CYP3A7 (B).**

The concentration of endogenous steroids,  $\alpha$ -naphthoflavone, and NVP was 100  $\mu$ M. Basal activities of 2- and 12-hydroxylation were 0.72 and 0.22 (CYP3A4), 0.01 and 0.01 nmol/nmol CYP/min (CYP3A7), respectively.

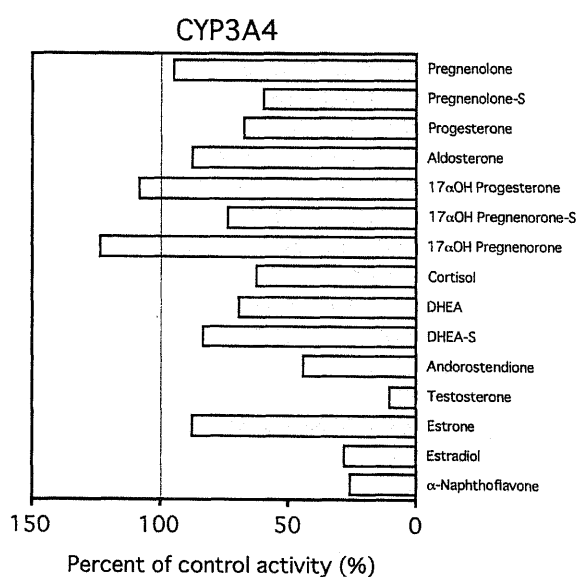


**Fig. 2-4 Effects of endogenous steroids and  $\alpha$ -naphthoflavone on TZM 1'- and 4-hydroxylation by expressed CYP3A4 (A) and CYP3A7 (B).**

The concentration of endogenous steroids,  $\alpha$ -naphthoflavone, and TZM was 100  $\mu$ M. Basal activities of 1'- and 4-hydroxylation were 11.32 and 14.00 (CYP3A4), 0.06 and 0.58 nmol/nmol CYP/min (CYP3A7), respectively.

Fig. 2-4 に CYP3A4 および CYP3A7 の TZM 1'-、4-水酸化酵素活性に及ぼす各種内因性ステロイドおよび $\alpha$ -ナフトフラボン添加の影響を示した。CYP3A4 においては、両水酸化反応を活性化させた内因性ステロイドは存在せず、多くの内因性ステロイドが両水酸化反応を阻害した。なお、活性低下の割合はほとんどの場合 4-水酸化よりも 1'-水酸化の方が大きかった。一方、CYP3A7 において、1.5 倍以上の活性上昇が認められたのはアンドロステンジオン添加時の 4-水酸化反応のみで、CYP3A4 同様、多くの内因性ステロイドが両水酸化反応を阻害した。また、活性低下の割合も CYP3A4 同様、4-水酸化よりも 1'-水酸化の方が大きかった。

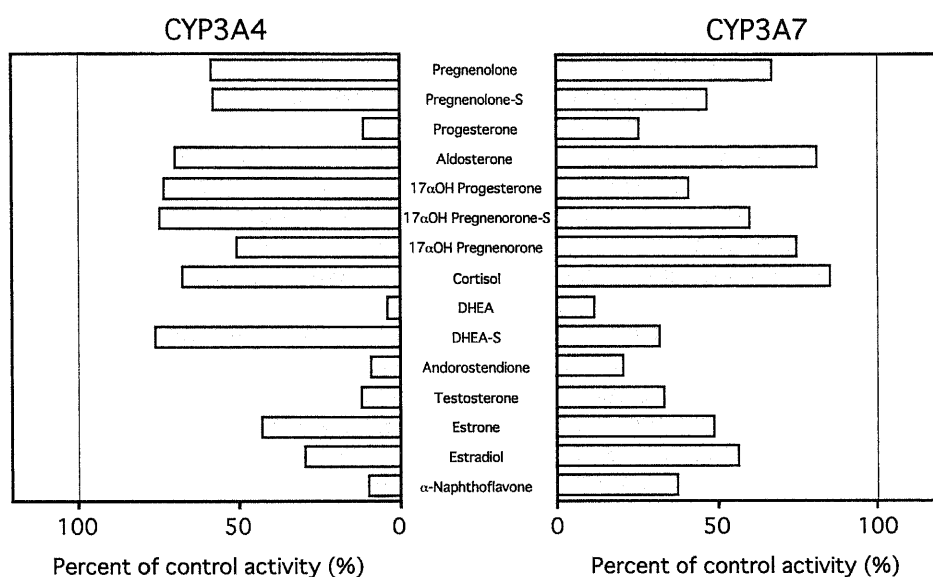
Fig. 2-5 に CYP3A4 の EM *N*-脱メチル化酵素活性に及ぼす各種内因性ステロイドおよび $\alpha$ -ナフトフラボン添加の影響を示した。アンドロステンジオン、テストステロン、エストラジオールおよび $\alpha$ -ナフトフラボン添加により EM *N*-脱メチル化酵素活性はコントロール活性と比較して 50%以下に低下した。CYP3A7 に関しては、測定感度の問題から検討することができなかった。



**Fig. 2-5 Effects of endogenous steroids and  $\alpha$ -naphthoflavone on EM *N*-demethylation by expressed CYP3A4.**

The concentration of endogenous steroids,  $\alpha$ -naphthoflavone, and EM was 100  $\mu$ M. Basal activity was 6.15 nmol/nmol CYP/min.

Fig. 2-6 に CYP3A4 の ZNS 還元酵素活性に及ぼす各種内因性ステロイドおよび $\alpha$ -ナフトフラボン添加の影響を示した。CYP3A4、CYP3A7 とも ZNS 還元酵素活性を 1.5 倍以上上昇させた内因性ステロイドは存在せず、すべてのステロイドで活性低下をきたした。阻害の受け方は CYP3A4 と CYP3A7 で類似しており、特にプロゲステロン、DHEA、アンドロステンジオン、テストステロン、エストロンおよび $\alpha$ -ナフトフラボンにより、CYP3A4 と CYP3A7 ともコントロール活性の 50%以下に活性が低下した。

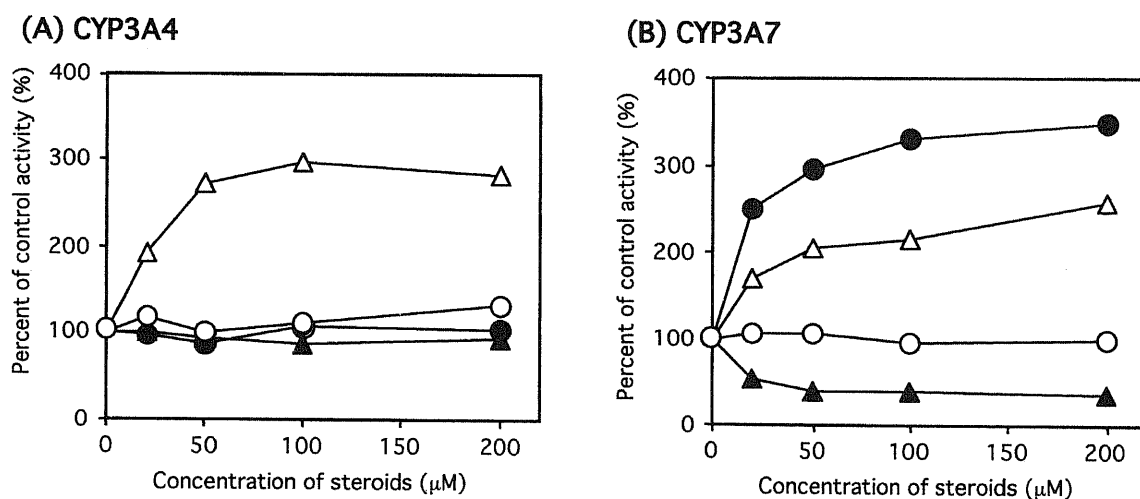


**Fig. 2-6 Effects of endogenous steroids and  $\alpha$ -naphthoflavone on SMAP formation from ZNS by expressed CYP3A4 (A) and CYP3A7 (B).**

The concentration of endogenous steroids,  $\alpha$ -naphthoflavone, and ZNS was 100  $\mu$ M.

Basal activities of CYP3A4 and CYP3A7 were 0.86 and 0.21 nmol/nmol CYP/min, respectively.

発現 CYP3A4 および CYP3A7 による CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性について、4 種類の内因性ステロイド（アルドステロン、アンドロステンジオン、DHEA-S、エストラジオール）の濃度変化と活性の変化について検討を行った。Fig. 2-7 (A) に示したように、CYP3A4 による CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性は、アンドロステンジオン添加により濃度依存的に上昇した。アルドステロン、DHEA-S、エストラジオールはいずれも濃度依存的な活性の変化は認められなかった。一方、Fig. 2-7 (B) に示したように、CYP3A7 による CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性は、DHEA-S、アンドロステンジオン添加により濃度依存的に上昇し、エストラジオール添加により濃度依存的に低下した。アルドステロン添加では濃度依存的な活性変化は認められなかった。



**Fig. 2-7 Concentration-dependent effects of endogenous steroids on CBZ 10,11-epoxidation by expressed CYP3A4 (A) and CYP3A7 (B).**

The concentration of CBZ was 100 μM.

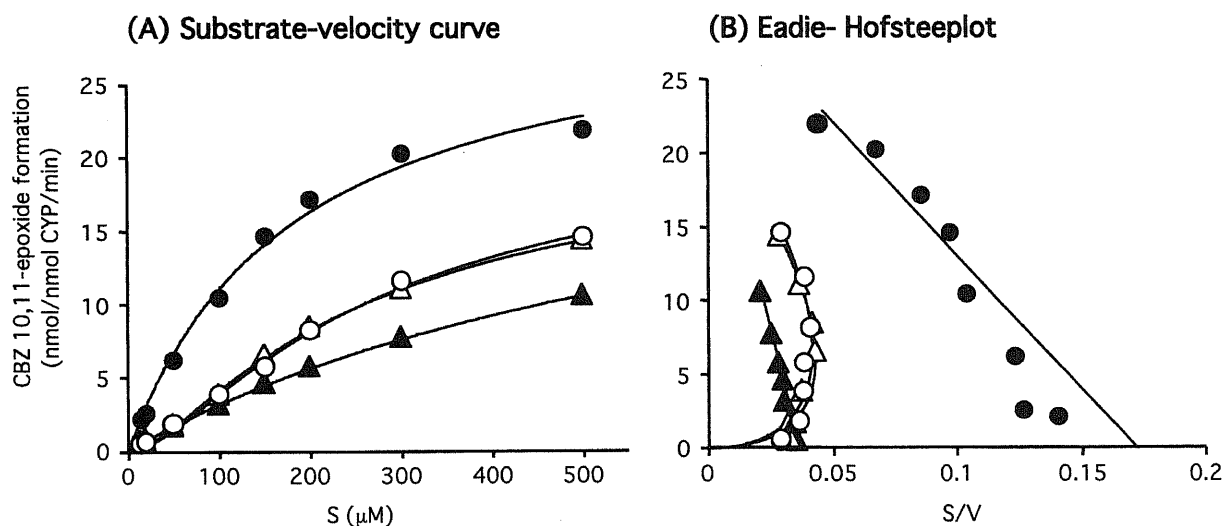
○, Aldosterone; ●, DHEA-S; △, Androstendione; ▲, Estradiol.



## II-1-2-b 反応速度論的検討

CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性を変化させた内因性ステロイドの影響について、さらに詳細に検討するために、発現 CYP3A4 および CYP3A7 を酵素源としてアンドロステンジオン、エストラジオール、DHEA-S 添加と非添加時で反応速度論的検討を行った。

Fig. 2-8 に発現 CYP3A4 による CBZ 10,11-エポキシ化の substrate-velocity curve および Eadie-Hofstee plot を、Table 2-1 に Michaelis-Menten 式および 2-binding site モデルによる解析で算出した反応速度論パラメータを示した。ステロイド非添加時の CYP3A4 による CBZ 10,11-エポキシ化の速度論曲線はシグモイド型を示し、2-binding site モデルによる解析より、速度論パラメータは  $K_{m1} = 104.8 \mu\text{M}$ 、 $K_{m2} = 248.3 \mu\text{M}$ 、 $V_{\text{max}2} = 23.638 \text{ nmol/nmol CYP/min}$  と算出された。アンドロステンジオンの添加により  $K_{m1}$  は  $12.8 \mu\text{M}$  と顕著に低下し、シグモイド曲線は Michaelis-Menten 型へ変化した。また、同時に  $K_{m2}$  の低下と  $V_{\text{max}2}$  の増加が認められ、 $V_{\text{max}2}/K_{m2}$  はアンドロステンジオン添加により 2 倍以上に増加した。エストラジオールの添加も  $K_{m1}$  の顕著な低下をきたし、反応速度論曲線は Michaelis-Menten 型に変化した。しかし、 $V_{\text{max}2}$  はほとんど変化せず  $K_{m2}$  が 3 倍近く増加したため、 $V_{\text{max}2}/K_{m2}$  は顕著に低下した。DHEA-S の添加による反応速度論パラメータの変化は認められなかった。



**Fig. 2-8 Substrate-velocity curve (A) and Eadie-Hofstee plot (B) of CBZ 10,11-epoxidation by expressed CYP3A4.**

The reactions were performed in the absence or presence of  $100 \mu\text{M}$  effectors. Lines were drawn using data analyzed by the modified two-site equation for CBZ only, plus DHEA-S, and by Michaelis-Menten equation for plus androstendione, plus estradiol, respectively.

○, CBZ only; △, plus DHEA-S; ●, plus androstendione; ▲, plus estradiol.

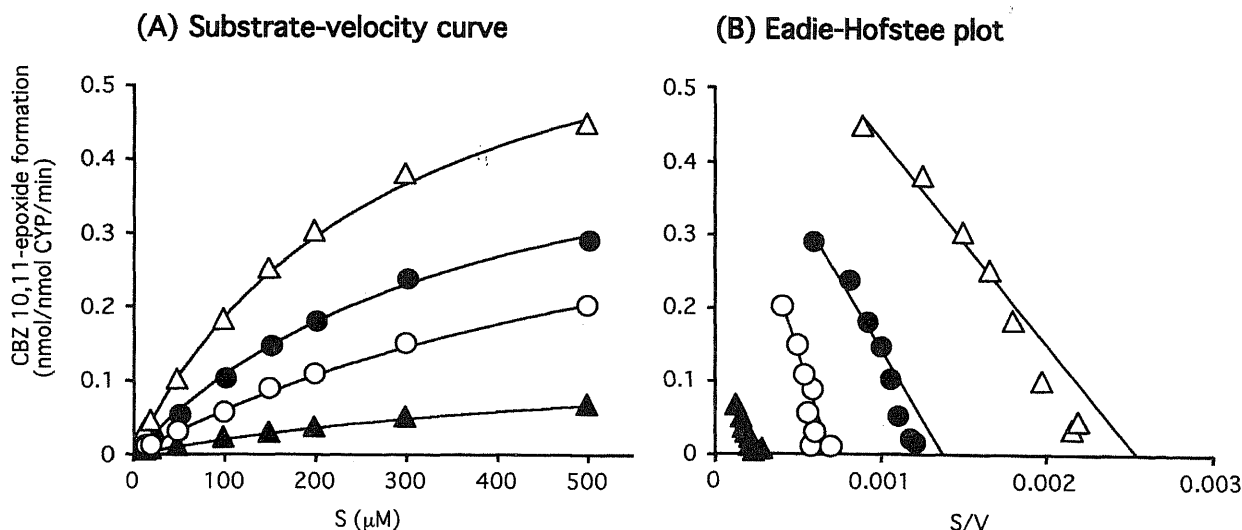
**Table 2-1 Kinetic parameters of CBZ 10,11-epoxidation by expressed CYP3A4**

	CBZ only	Plus androstendione	Plus estradiol	Plus DHEA-S
$K_m$	-	181.0	702.4	-
$V_{max}$	-	31.17	25.49	-
$V_{max} / K_m$	-	0.17221	0.03629	-
$K_{m1}$	104.8	12.8	2.1	80.9
$K_{m2}$	248.3	139.5	666.9	246.4
$V_{max2}$	23.64	29.028	24.762	22.589
$V_{max2} / K_m$	0.09521	0.20809	0.03713	0.09168

Substrate concentration used was 15-500  $\mu\text{M}$ . The reactions were performed in the absence or presence of 100  $\mu\text{M}$  effectors. Units of the constants are as follows:  $K_m$  (apparent),  $\mu\text{M}$ ; and  $V_{max}$ , nmol/nmol CYP/min.  $K_m$  and  $V_{max}$  were calculated by Michaelis-Menten equation.

$K_{m1}$ ,  $K_{m2}$  and  $V_{max2}$  were calculated by the modified two-site equation ( $V_{max1}=0$ ).  
 $V = (V_{max2} S^2 / K_{m1} K_{m2}) / (1 + S / K_{m1} + S^2 / K_{m1} K_{m2})$  (Korezekwa et al., 1998)

Fig. 2-9 に発現 CYP3A7 による CBZ 10,11-エポキシ化の substrate-velocity curve および Eadie-Hofstee plot を、Table 2-2 に反応速度論パラメータを示した。CYP3A7 による CBZ 10,11-エポキシ化の反応速度論曲線はステロイドの存否に関わらずすべて Michaelis-Menten 型を示した。アンドロステンジオンおよび DHEA-S の添加により  $K_m$  の低下が認められ、 $V_{max}/K_m$  はそれぞれ約 2 倍、3.7 倍に増加した。DHEA-S 添加においては  $V_{max}$  の増加も認められた。エストラジオール添加においては  $K_m$  はほとんど変化しないかむしろ低下傾向であったが、 $V_{max}$  が顕著に低下し、 $V_{max}/K_m$  は約 1/3 に低下した。



**Fig. 2-9 Substrate-velocity curve (A) and Eadie-Hofstee plot (B) of CBZ 10,11-epoxidation by expressed CYP3A7.**

The reactions were performed in the absence or presence of 100 $\mu\text{M}$  effectors. Lines were drawn using data analyzed by Michaelis-Menten equation.

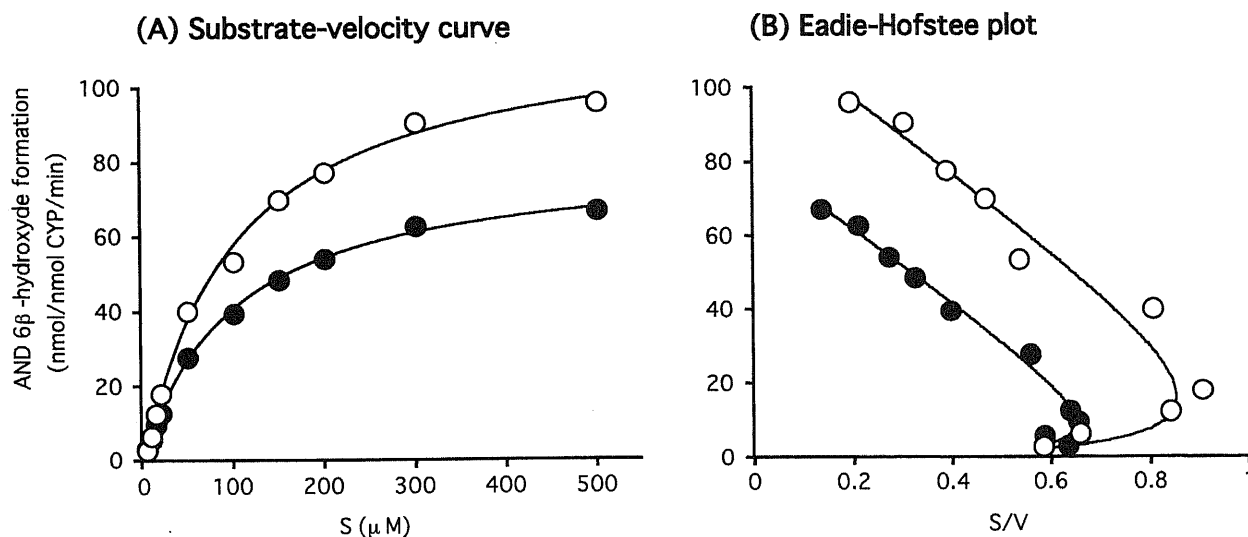
○, CBZ only; △, plus DHEA-S; ●, plus androstendione; ▲, plus estradiol.

**Table 2-2 Kinetic parameters of CBZ 10,11-epoxidation by expressed CYP3A7**

	CBZ only	Plus androstendione	Plus estradiol	Plus DHEA-S
$K_m$	720.9	382.8	616.7	280.1
$V_{max}$	0.496	0.526	0.148	0.711
$V_{max} / K_m$	0.00069	0.00137	0.00024	0.00254

Substrate concentration used was 15-500  $\mu\text{M}$ . The reactions were performed in the absence or presence of 100  $\mu\text{M}$  effectors. Units of the constants are as follows:  $K_m$  (apparent),  $\mu\text{M}$ ; and  $V_{max}$ , nmol/nmol CYP/min.  $K_m$  and  $V_{max}$  were calculated by Michaelis-Menten equation.

次に、CYP3A4 および CYP3A7 による CBZ 10,11-エポキシ化反応をそれぞれ顕著に活性化させたアンドロステンジオンおよび DHEA-S に着目し、CBZ の存在がこれらのステロイド代謝に如何なる影響を及ぼすかについて検討を行った。Fig. 2-10 に発現 CYP3A4 によるアンドロステンジオン 6 $\beta$ -水酸化反応の substrate-velocity curve および Eadie-Hofstee plot を、Table 2-3 に反応速度論パラメータを示した。CYP3A4 によるアンドロステンジオン 6 $\beta$ -水酸化の反応速度論曲線は CBZ の存否に関わらずシグモイド型であった。CBZ 添加により  $K_{m2}$  は変化しなかったが、 $V_{max2}$  がやや低下し、 $V_{max2}/K_{m2}$  はやや低下した。



**Fig. 2-10 Substrate-velocity curve (A) and Eadie-Hofstee plot (B) of androstendione 6 $\beta$ -hydroxylation by expressed CYP3A4.**

The reactions were performed in the absence or presence of 100 $\mu\text{M}$  effectors. Lines were drawn using data analyzed by the modified two-site equation.

○, Androstendione only; ●, plus CBZ.

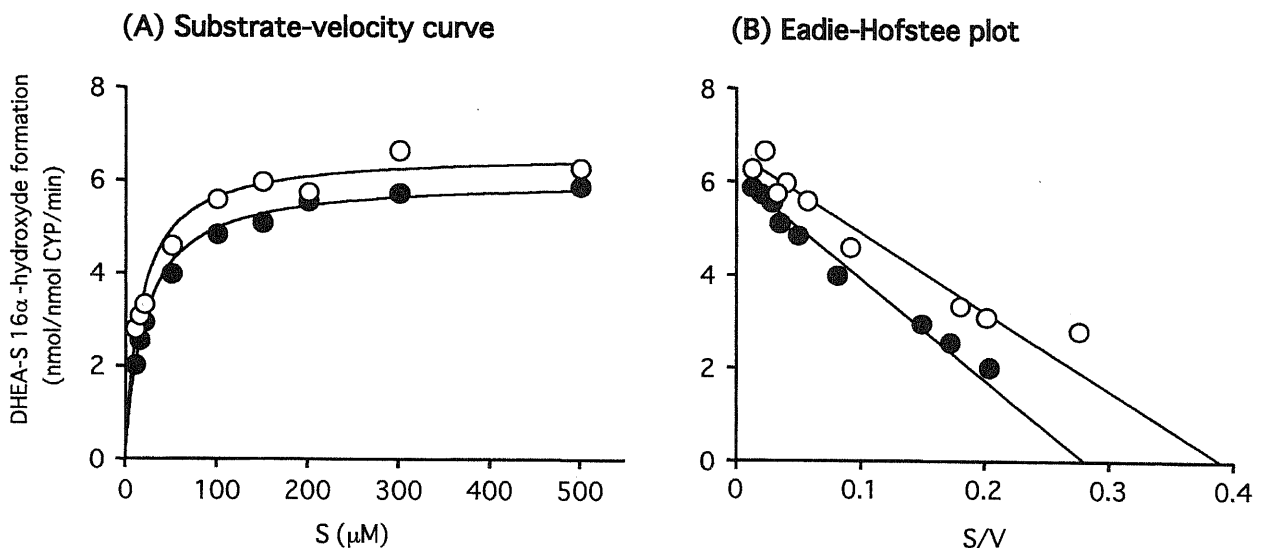
**Table 2-3 Kinetic parameters of androstendione 6 $\beta$ -hydroxylation by expressed CYP3A4**

	Androstendione only	Plus CBZ
$K_{m1}$	3.5	2.0
$K_{m2}$	100.3	97.8
$V_{max2}$	117.493	81.370
$V_{max2} / K_{m}$	1.17142	0.83200

Substrate concentration used was 5-500  $\mu$ M. The reactions were performed in the absence or presence of 100  $\mu$ M CBZ. Units of the constants are as follows:  $K_m$  (apparent),  $\mu$ M; and  $V_{max}$ , nmol/nmol CYP/min.

$K_{m1}$ ,  $K_{m2}$  and  $V_{max2}$  were calculated by the modified two-site equation ( $V_{max1}=0$ ).  
 $V = (V_{max2} S^2 / K_{m1} K_{m2}) / (1 + S / K_{m1} + S^2 / K_{m1} K_{m2})$  (Korezekwa et al., 1998)

Fig. 2-11 に発現 CYP3A7 による DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化反応の substrate-velocity curve および Eadie-Hofstee plot を、Table 2-4 に反応速度論パラメータを示した。CYP3A7 による DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化の反応速度論曲線は CBZ の存否に関わらず Michaelis-Menten 型を示した。CBZ の添加による  $K_m$  および  $V_{max}$  の顕著な変化は認められなかった。



**Fig. 2-11 Substrate-velocity curve (A) and Eadie-Hofstee plot (B) of DHEA-S 16 $\alpha$ -hydroxylation by expressed CYP3A7.**

The reactions were performed in the absence or presence of 100 $\mu$ M effectors. Line were drawn using data analyzed by the modified two-site equation.

○, DHEA-S only; ●, plus CBZ.

**Table 2-4 Kinetic parameters of DHEA-S 16 $\alpha$ -hydroxylation by expressed CYP3A7**

	DHEA-S only	Plus CBZ
$K_m$	17.0	21.5
$V_{max}$	6.604	6.48
$V_{max} / K_m$	0.38847	0.28130

Substrate concentration used was 10-500  $\mu$ M. The reactions were performed in the absence or presence of 100  $\mu$ M CBZ. Units of the constants are as follows:  $K_m$  (apparent),  $\mu$ M; and  $V_{max}$ , nmol/nmol CYP/min.  $K_m$  and  $V_{max}$  were calculated by Michaelis-Menten equation.

## 第2節 ヒト肝ミクロゾームによる検討

第1節において発現 CYP3A4 を酵素源とし、各種内因性ステロイドを添加し、各種薬物代謝酵素活性を測定したところ、一部の内因性ステロイドの存在により薬物代謝酵素活性および反応速度論曲線のパターンが変化することが明らかとなった。本節では酵素源として、生体により近いと考えられるヒト成人肝ミクロゾームを用い、発現 CYP3A4 を用いた場合と同様の現象が観察されるか否かについて検討を行った。

### II-2-1 実験方法

#### II-2-1-a 実験材料および試薬

実験に用いたヒト成人肝ミクロゾームは HL214 (38.7 mg prot./mL、0.351 nmol CYP/mL; 57 才、男性) である。その他の試薬、酵素類は第1節と同様のものを使用した。

#### II-2-1-b 代謝酵素活性測定法

CBZ 10,11-エポキシ化、NVP 水酸化および ZNS 還元酵素活性の測定はミクロゾーム蛋白濃度 1 mg/mL にて、TZM 水酸化酵素活性の測定は 0.2 mg/mL にて、EM *N*-脱メチル化酵素活性の測定は 0.5 mg/mL にて、1 mL の反応液で行った (33)。それ以外の操作は発現ミクロゾームの場合と同様の方法で行った。

#### II-2-1-c 各種内因性ステロイドを用いた添加実験

ヒト成人肝ミクロゾームによる薬物代謝酵素活性に及ぼす各種内因性ステロイドの影響について検討を行う目的で、各種内因性ステロイドおよび $\alpha$ -ナフトフラボンを反応系に添加し、第1節と同様5種の薬物で代謝酵素活性変化を測定した。基質、各種内因性ステロイドおよび $\alpha$ -ナフトフラボンはすべて 100  $\mu$ M となるように反応系に添加した。

また、ヒト成人肝ミクロゾームによる CBZ 10,11-エポキシ化および ZNS 還元酵素活性に及ぼす内因性ステロイド添加濃度の影響について検討を行った。アルドステロン、DHEA、アンドロステンジオンおよびテストステロンを 25、50、100、200  $\mu$ M となるように反応系に添加し、CBZ 10,11-エポキシ化および ZNS 還元酵素活性の変化を測定した。なお、CBZ および ZNS の濃度はいずれも 100  $\mu$ M にて行った。

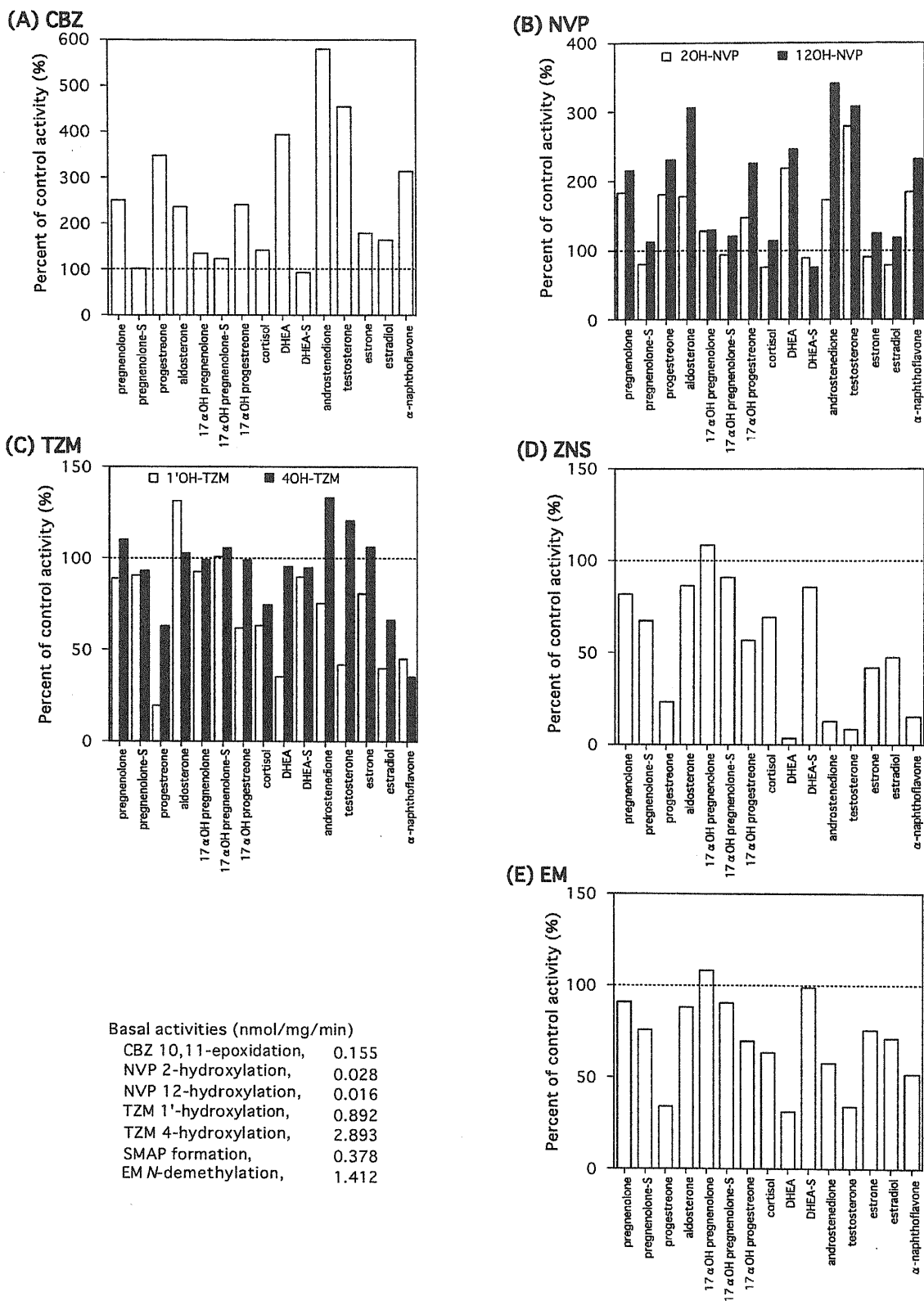
さらに、アンドロステンジオン、CBZ、ZNS が共存することにより互いの反応速度論パラメータに如何に影響を及ぼし合うかについて検討を行った。反応速度論解析における基質濃度は 15、20、30、50、75、100、150、200、300、500、750、1000  $\mu$ M のうち、CBZ が 15~500  $\mu$ M の 10 ポイント、ZNS が 15~1000  $\mu$ M の 12 ポイント、アンドロステンジオンが 15~300  $\mu$ M の 9 ポイントで行い、effector としての CBZ、ZNS およびアンドロステンジオンはいずれも 100  $\mu$ M となるように反応系に添加した。なお、反応速度論パラメータの算出は第1章と同様の方法にて行った。

## II-2-2 結果

### II-2-2-a 内因性ステロイドの各種薬物代謝酵素活性に及ぼす影響

Fig. 2-12 に CBZ 10,11-エポキシ化、TZM 1'-, 4-水酸化、NVP 2-, 12-水酸化、EM *N*-脱メチル化および ZNS 還元酵素活性に及ぼす各種内因性ステロイドおよび $\alpha$ -ナフトフラボン添加の影響を示した。多くの内因性ステロイドが CBZ 10,11-エポキシ化、NVP 2-, 12-水酸化酵素活性を上昇させ、発現 CYP3A4 を用いた場合と同様、DHEA、アンドロステンジオン、テストステロンといったアンドロゲンはいずれの活性を著しく上昇させた。最も顕著な活性上昇が認められたのは、アンドロステンジオン添加による CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性であり、コントロールの約 6 倍に活性が上昇した。TZM 水酸化酵素活性においては、1.5 倍以上活性を上昇させた内因性ステロイドは存在せず、多くの内因性ステロイドにより活性が阻害された。阻害の受け方は 1'-水酸化の方が 4-水酸化よりも強かった。EM *N*-脱メチル化酵素活性と ZNS 還元酵素活性はほとんどの内因性ステロイド添加により阻害された。特に、NVP 2-, 12-水酸化酵素活性と CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性を大きく活性化させた DHEA、アンドロステンジオン、テストステロンは、EM *N*-脱メチル化と ZNS 還元酵素活性を反対に強く阻害した。

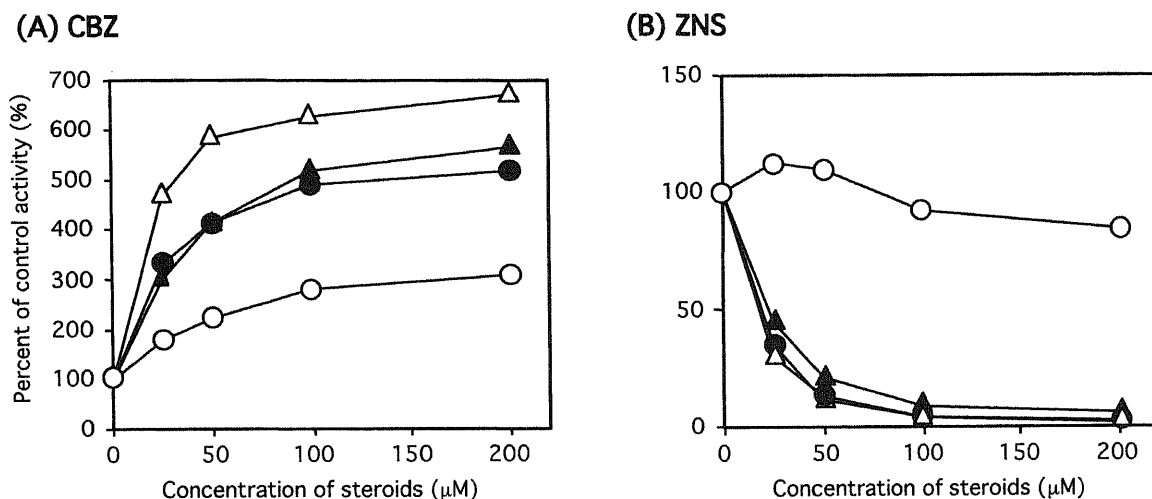
一部の内因性ステロイド添加により特に大きな活性変化が認められた CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性と ZNS 還元酵素活性について、4 種類の内因性ステロイド（アルドステロン、DHEA、アンドロステンジオン、テストステロン）の添加濃度変化による影響について検討を行った。Fig. 2-13(A)に示したように、CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性は、これら 4 種類すべての内因性ステロイド添加により、濃度依存的に上昇した。特に、アンドロステンジオンは強力な活性化惹起物質であり、低濃度 (25  $\mu$ M) においてもコントロールに比べ 4 倍以上活性を上昇させた。対照的に ZNS 還元酵素活性は、DHEA、アンドロステンジオン、テストステロンにより濃度依存的に阻害を受け (Fig. 2-13(B))、低濃度 (25  $\mu$ M) においても、コントロール活性の 50%以下に活性が低下した。アルドステロンは ZNS 還元酵素活性に対しほとんど影響を及ぼさず、CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性の活性化も他の 3 種の内因性ステロイドに比べ小さかった。



**Fig. 2-12** Effects of endogenous steroids and  $\alpha$ -naphthoflavone on CBZ 10,11-epoxidation (A), NVP 2-, 12-hydroxylation (B), TZM 1'-, 4-hydroxylation (C), EM *N*-demethylation (D), and SMAP formation (E) by human liver microsomes.

The concentration of endogenous steroids,  $\alpha$ -naphthoflavone, and drugs was 100  $\mu$ M.





**Fig. 2-13 Concentration-dependent effects of endogenous steroids on CBZ 10,11-epoxidation (A) and SMAP formation (B) by human liver microsomes.**

The concentration of CBZ and ZNS was 100 μM.

○, Aldosterone; ●, DHEA; △, Androstendione; ▲, Testosterone.

#### II-2-2-b 反応速度論的検討

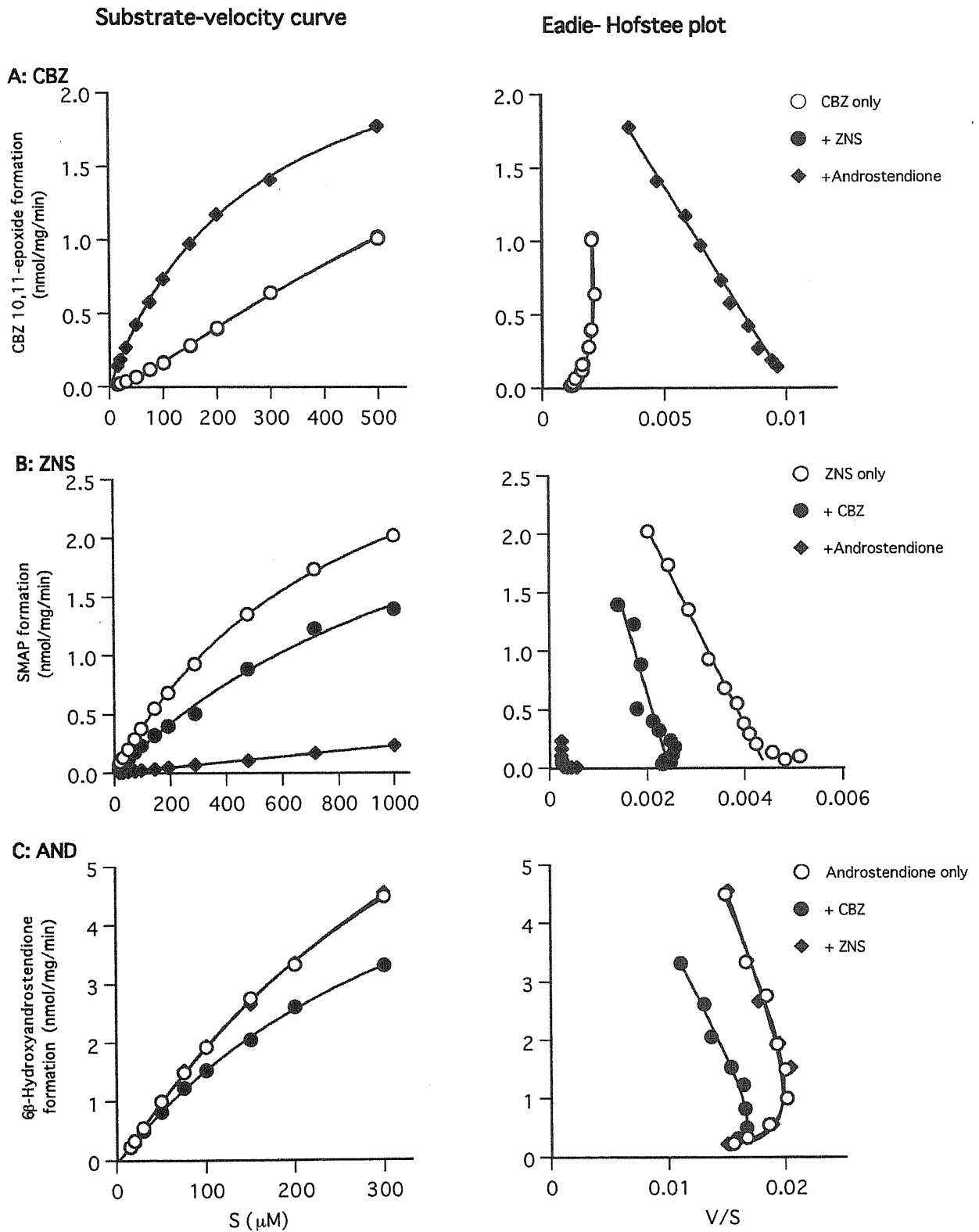
CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性、ZNS 還元酵素活性をそれぞれ特に顕著に活性化、阻害したアンドロステンジオンに関し、その添加が両反応の反応速度論パラメータを如何に変化させるかについて検討を行った。また、アンドロステンジオン 6β-水酸化酵素活性に対しCBZ、ZNSの存在が如何なる影響を及ぼすかについての検討も併せて行った。

Fig. 2-14 (A)にCBZ 10,11-エポキシ化酵素活性に及ぼすアンドロステンジオンおよびZNSの影響を示した。成人肝ミクロゾームによるCBZ 10,11-エポキシ化の反応速度論曲線は、発現CYP3A4を酵素源とした場合と同様シグモイド型を示した。アンドロステンジオン添加はCBZ 10,11-エポキシ化の大幅な活性上昇をもたらし、特にその影響は低基質濃度で顕著であった。また、アンドロステンジオン添加により反応速度論曲線はシグモイド型からMichaelis-Menten型に変化した。2-binding siteモデルによる解析より、CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性の $K_{m1}$ 、 $K_{m2}$ はアンドロステンジオンの添加によりいずれも低下し、特に $K_{m1}$ は71.6 μMから0.1 μMへと著しく低下した (Table 2-5)。アンドロステンジオン添加時の速度論解析はMichaelis-Menten式でも解析可能で、その時の速度論パラメータは、 $K_m = 268.7 \mu\text{M}$ 、 $V_{max} = 2.7 \text{ nmol/mg/min}$ と2-binding siteモデルによる、 $K_{m2} = 267.8 \mu\text{M}$ 、 $V_{max} = 2.7 \text{ nmol/mg/min}$ とほぼ同等であった。一方、ZNSはCBZ 10,11-エポキシ化酵素活性に対して影響を及ぼさず、速度論パラメータの大きな変化は認められなかった。

Fig. 2-14 (B)にZNS還元酵素活性に及ぼすCBZおよびアンドロステンジオン添加の影響を示した。ZNS還元酵素活性はCBZ、アンドロステンジオン添加により阻害を受け、特にアンドロステンジオンにより強い阻害を受けた。ZNS還元反応は、effectorの存否

にかかわらず、Michaelis-Menten モデルにて解析可能であった。アンドロステンジオン添加により ZNS 還元反応の  $K_m$  は約 30 倍 (843.5  $\mu\text{M}$  to 24118.0  $\mu\text{M}$ ) に増加した (Table 2-5)。

Fig. 2-14 (C)にアンドロステンジオン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性に及ぼす CBZ および ZNS 添加の影響を示した。アンドロステンジオン 6 $\beta$ -水酸化の反応速度論曲線はシグモイド型を示し、CBZ 添加により高基質濃度で阻害を受け、 $V_{\max 2}$  の低下 (12.792 to 7.599 nmol/mg/min) が認められたが (Table 2-5)、シグモイド曲線の解消は認められなかった。一方、ZNS 添加による AND 6 $\beta$ -水酸化酵素活性の変化は認められなかった。



**Fig. 2-14 Substrate-velocity curve and Eadie-Hofstee plot of CBZ 10,11-epoxidation (A), SMAP formation (B), and androstendione 6 $\beta$ -hydroxylation (C).**

The reactions were performed in the absence or presence of 100  $\mu$ M effectors. Lines were drawn using data analyzed by the modified two-site equation for CBZ 10,11-epoxidation and androstendione 6 $\beta$ -hydroxylation and by Michaelis-Menten equation for SMAP formation.

**Table 2-5 Kinetic parameters of CBZ 10,11-epoxidation, SMAP formation from ZNS and androstendione 6 $\beta$ -hydroxylation by human liver microsomes**

	CBZ 10,11-epoxidation			SMAP formation from ZNS			Androstendione 6 $\beta$ -hydroxylation		
	CBZ only	Plus androstendione	Plus ZNS	ZNS only	Plus CBZ	Plus androstendione	Androstendione only	Plus CBZ	Plus ZNS
$K_m$	-	268.7	-	843.5	1441.8	24118.0	-	-	-
$V_{max}$	-	2.718	-	3.745	3.512	5.833	-	-	-
$V_{max}/K_m$	-	$10.12 \times 10^{-3}$	-	$4.44 \times 10^{-3}$	$2.44 \times 10^{-3}$	$0.24 \times 10^{-3}$	-	-	-
$K_{m1}$	71.6	0.1	63.0	-	-	-	5.7	3.4	7.9
$K_{m2}$	1384.4	267.8	1789.5	-	-	-	537.6	382.4	455.6
$V_{max2}$	4.225	2.714	5.156	-	-	-	12.792	7.599	11.44
$V_{max2}/K_{m2}$	$3.05 \times 10^{-3}$	$10.13 \times 10^{-3}$	$2.88 \times 10^{-3}$	-	-	-	$23.79 \times 10^{-3}$	$19.87 \times 10^{-3}$	$25.11 \times 10^{-3}$

The substrate concentrations used were 15-500  $\mu$ M for CBZ, 15-1000  $\mu$ M for ZNS, and 15-300  $\mu$ M for androstendione. The reactions were performed in the absence or presence of 100  $\mu$ M effectors. Units of constants were as follows:  $K_m$  (apparent),  $\mu$ M; and  $V_{max}$ , nmol/mg/min.  $K_{m1}$  and  $V_{max1}$  were calculated by Michaelis-Menten equation.  $K_{m2}$  and  $V_{max2}$  were calculated by the modified two-site equation ( $V_{max1} = 0$ )  $V = (V_{max2} S^2 / K_{m1} K_{m2}) / (1 + S / K_{m1} + S^2 / K_{m1} K_{m2})$  (Korezekwa et al., 1998).

### 第3節 考察

胎児期においては、内因性ステロイドホルモンの多くは副腎より分泌されるが、胎児の副腎は成人に比し体重比では15倍も大きい。また、胎児においては胎児層 (fetal zone) といった成人にはない皮質の外側を被う層が存在し、出生後徐々に退縮する。胎児層からは多量の DHEA-S が分泌されており、DHEA-S は胎児胎盤系を経て最終的にエストロゲンに代謝されるが、胎児の発育および妊娠の維持等に重要な役割を担っている。この様に、胎児期から新生児期にかけては成人と異なる内因性ステロイドの分泌パターンを示す。また、CYP3A はこれら内因性ステロイドの代謝にも関与することから、内因性ステロイドの CYP3A による薬物代謝酵素活性に及ぼす影響を明らかにする必要があると考えられた。そこで、本章においては各種内因性ステロイドが CYP3A の触媒する薬物代謝に対し如何なる影響を及ぼすかについて *in vitro* 系にて検討を行った。

発現 CYP3A4 およびヒト成人肝ミクロゾームによる NVP 水酸化活性と CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性はいくつかの内因性ステロイドにより活性化された。特に DHEA、アンドロステジオン、テストステロン、といったアンドロゲンは顕著にこれらの代謝酵素活性を活性化した。一方、これらのアンドロゲンは EM N-脱メチル化、ZNS 還元酵素活性に対しては逆に阻害作用を示した。これらの内因性ステロイドによる CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性の活性化や ZNS 還元酵素活性の阻害は濃度依存的であり、低濃度でもかなりの影響が認められたことから、*in vivo* においてもこれらのアンドロゲンが薬物代謝に対して影響を及ぼす可能性は否定できない。過去の多くの報告は、一般に女性の方が男性よりも CYP3A4 活性が高いと報告している。たとえば、Watkins らは、EM プレストテストをラージスケールで行い、女性の方が男性よりも  $^{14}\text{CO}_2$  放出が有意に高いことを報告している (34, 35)。今回の検討で、アンドロゲンは EM N-脱メチル化をエストロゲンよりも強力に阻害したことから、EM プレストテストに見られた性差はステロイドホルモンレベルの性差が一因としてあるのかもしれない。一方、Susan らは、NVP の副作用である皮疹の発生率の性差について報告している (36)。彼らは実際に NVP 血中濃度の測定を行っていないが、NVP 投与により女性では男性の7倍の深刻な皮疹のリスク増加と、3.5倍の NVP 治療の中止があったと報告している。このデータは、女性の方が男性よりも NVP の代謝クリアランスが低い可能性を示唆しており、今回の結果 (NVP の 2-, 12-水酸化酵素活性はアンドロゲンにより大きく活性化された) と矛盾しないものである。

一方、発現 CYP3A7 による薬物代謝酵素活性は CYP3A4 とは異なる種類の内因性ステロイドにより影響を受けた。CBZ 10,11-エポキシ化は CYP3A7 においてはプレグネノロン-S、 $17\alpha$ -水酸化プレグネノロン-S、DHEA-S といった3位の硫酸抱合ステロイドの添加によって顕著に活性化された。これらの硫酸抱合ステロイドは CYP3A4 においては活性上昇が認められなかったものである。特に DHEA-S は CBZ 10,11-エポキシ化のみならず、NVP 2-, 12-水酸化酵素活性も活性化、TZM 4-水酸化酵素活性も若干ではあるが活性化させた。DHEA-S 以外の硫酸抱合ステロイドは NVP および TZM 水酸化活性に対しては影響を及ぼさなかった。DHEA-S が CYP3A7 による薬物代謝酵素活性に対して影響を及ぼすといった結果は非常に興味深いものである。なぜならば、前述のごとく、DHEA-S は胎児期、新生児期において血中に高濃度に存在しており、出生時の血中濃度

は約 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  程度とされ (37)、これは約 2.5  $\mu\text{M}$  に相当する。今回 *in vitro* で検討を行った DHEA-S の最低濃度は 25  $\mu\text{M}$  であるが、25  $\mu\text{M}$  においても CBZ 10,11-エポキシ化活性は約 2.5 倍活性上昇が認められており、低濃度域においても活性化作用はかなりあるものと考えられた。さらに、DHEA-S の様な有機アニオンは LST-1 らの有機アニオントランスポータ (38, 39) により濃縮的に肝細胞中に取り込まれ、肝細胞中での濃度は血中濃度よりもかなり高値をとることが予想される。したがって、DHEA-S は *in vivo* においてもこれらの薬物代謝活性に影響を与える可能性が高いと考えられた。

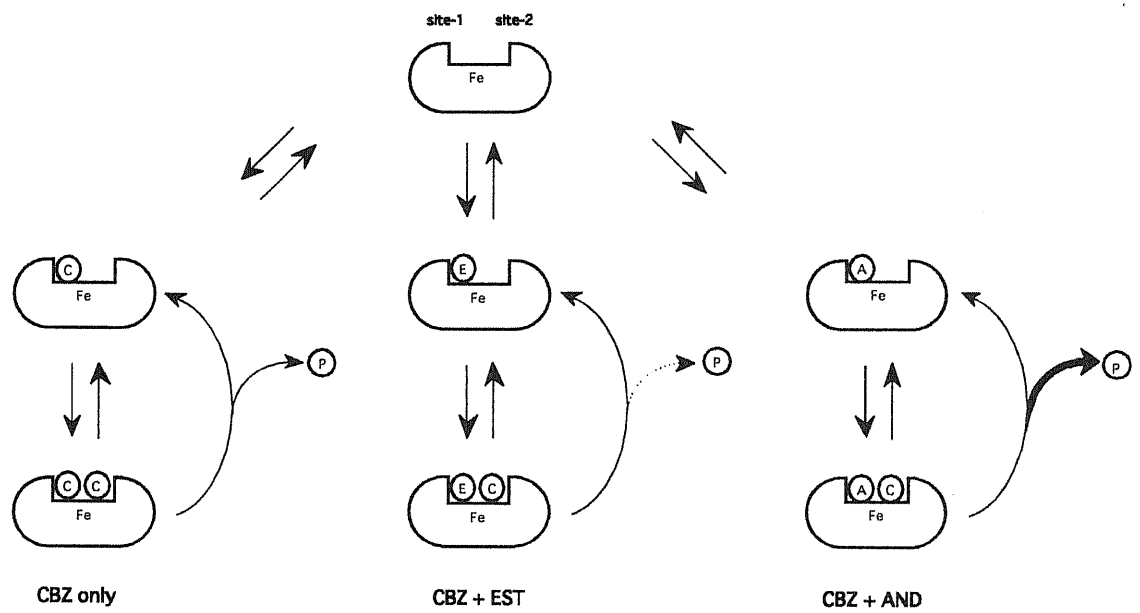
次に、内因性ステロイドによる薬物代謝酵素活性の活性化や阻害のメカニズムに関して考察を行った。まず、アンドロステンジオン添加で発現 CYP3A4 およびヒト成人肝ミクロゾームによる CBZ 10,11-エポキシ化の反応速度論曲線がシグモイド型から Michaelis-Menten 型へ変化した理由についてであるが、アンドロステンジオンの site-1 へのアフィニティーは CBZ と比較して高いため ( $K_{m1}$  が発現 CYP3A4 で 3.5 vs 104.8  $\mu\text{M}$ 、ヒト成人肝ミクロゾームで 5.7 vs 71.6  $\mu\text{M}$ )、CBZ とアンドロステンジオンが共存すると site-1 はアンドロステンジオンで占有されると考えられる。よって、CBZ は site-1 へ結合しにくくなるが、見かけ上アンドロステンジオン添加により CBZ の  $K_{m1}$  は低下することとなる。実際、アンドロステンジオン添加時の CBZ 10,11-エポキシ化反応における  $K_{m1}$  は、発現 CYP3A4 において 12.8  $\mu\text{M}$ 、ヒト成人肝ミクロゾームにおいて 0.1  $\mu\text{M}$  と非添加時と比較して大幅に低下した。従って、CBZ の反応速度論解析において site-1 の存在は無視できることとなり、アンドロステンジオン共存時の CBZ 10,11-エポキシ化の反応速度論曲線はシグモイド型から通常の Michaelis-Menten 型に変化したものと考えられた。また、発現 CYP3A4 でのエストラジオール添加においても  $K_{m1}$  の低下が認められ (104.8 to 2.1  $\mu\text{M}$ )、アンドロステンジオン添加時と同様、反応速度論曲線がシグモイド型から Michaelis-Menten 型へ変化した。一方、DHEA-S 添加では極端な  $K_{m1}$  の低下は認められず (104.8 to 80.9  $\mu\text{M}$ )、シグモイド曲線の解消には至らなかったものと考えられた。次に、アンドロステンジオンおよびエストラジオール添加による活性変化に関してであるが、活性上昇の認められたアンドロステンジオンでは、その添加により  $K_{m1}$  の低下と同時に  $K_{m2}$  の低下が認められた (発現 CYP3A4 で 248.3 to 139.5  $\mu\text{M}$ 、ヒト成人肝ミクロゾームで 1384.4 to 267.8  $\mu\text{M}$ )。  $V_{\text{max}2}$  は発現 CYP3A4 においては若干上昇したものの、ヒト成人肝ミクロゾームにおいては逆に低下したことから、アンドロステンジオン添加による CBZ 10,11-エポキシ化活性の上昇は  $K_{m2}$  の低下、つまり site-2 へのアフィニティーの増加によるものと考えられた。一方、エストラジオールの添加では、 $V_{\text{max}2}$  はほとんど変化しなかったが、 $K_{m2}$  は 3 倍近く上昇が認められ、site-2 へのアフィニティー低下により活性低下をきたすものと考えられた。アンドロステンジオンやエストラジオールの添加により何故 CBZ の site-2 へのアフィニティー変化が起こるのかについてであるが、site-1 へこれらのステロイドが結合することにより site-2 の構造変化が生じ、そのため CBZ の site-2 へのアフィニティーに変化が生じることや、活性ポケット内での基質同士の相互作用による触媒効率の変化が生じる可能性が考えられた。Fig. 15(A)に 2-binding site モデルにより考案した CYP3A4 による CBZ 10,11-エポキシ化反応に対するアンドロステンジオンおよびエストラジオールの影響についての仮説を模式的に示した。

ヒト成人肝ミクロゾームを用いた検討においては、ZNS 還元反応に及ぼす CBZ および

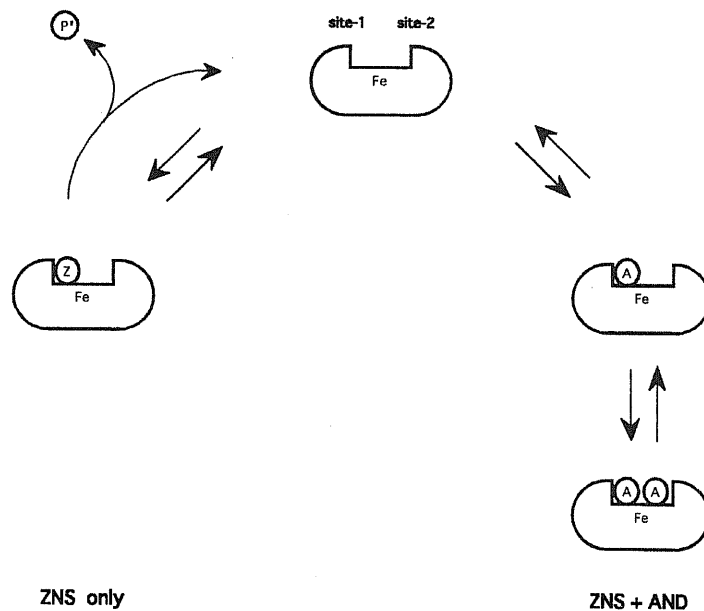
アンドロステンジオン添加の影響についても検討を行った。その結果、ZNS還元反応は、ZNSの $K_m$ よりも小さい $K_{m1}$ 値をもつアンドロステンジオンおよびCBZにより阻害を受け、特にsite-1へのアフィニティーが高いアンドロステンジオンにより強力に阻害された。また、ZNS単独での $K_m$ 値は $844\ \mu\text{M}$ とCBZのsite-2へのアフィニティー( $K_{m2}=1384\ \mu\text{M}$ )より高いにもかかわらず、ZNSはCBZの代謝に全く影響を及ぼさなかったことから、ZNSはsite-2ではなくsite-1で代謝されると考えられた (Fig. 15 (B))。

CYP3A7によるCBZ 10,11-エポキシ化の反応速度論曲線はMichaelis-Menten型を示したことから、CYP3A7はCYP3A4の場合と異なり、CBZに対して複数の基質結合部位は存在せず、単一の部位でしかCBZと相互作用しないものと考えられた。また、一方でCYP3A7においてはCBZのsite-1へのアフィニティーが非常に高いため、見かけ上Michaelis-Menten型を示すことも考えられた。しかしながら、CBZとDHEA-Sの共存において、互いの代謝酵素活性を阻害しなかったこと、また、いずれの反応速度論曲線もMichaelis-Menten型のままで変化が認められなかったことから、CYP3A7においては、CBZとDHEA-Sはそれぞれ別々のsiteで代謝を受ける可能性が高いと考えられた。DHEA-SによるCBZ 10,11-エポキシ化酵素活性の活性化は、CYP3A4におけるアンドロステンジオン添加の場合と同様、DHEA-Sのsite-1への結合がsite-2の構造変化を生じさせ、CBZのsite-2へのアフィニティーを上昇させること、あるいは、活性ポケット内でのCBZとDHEA-Sの相互作用により触媒効率の変化が生じる可能性が考えられた。Fig. 2-16に2-binding siteモデルにより考案したCYP3A7によるCBZ 10,11-エポキシ化反応に対するDHEA-Sの影響についての仮説を模式的に示した。

(A) CBZ



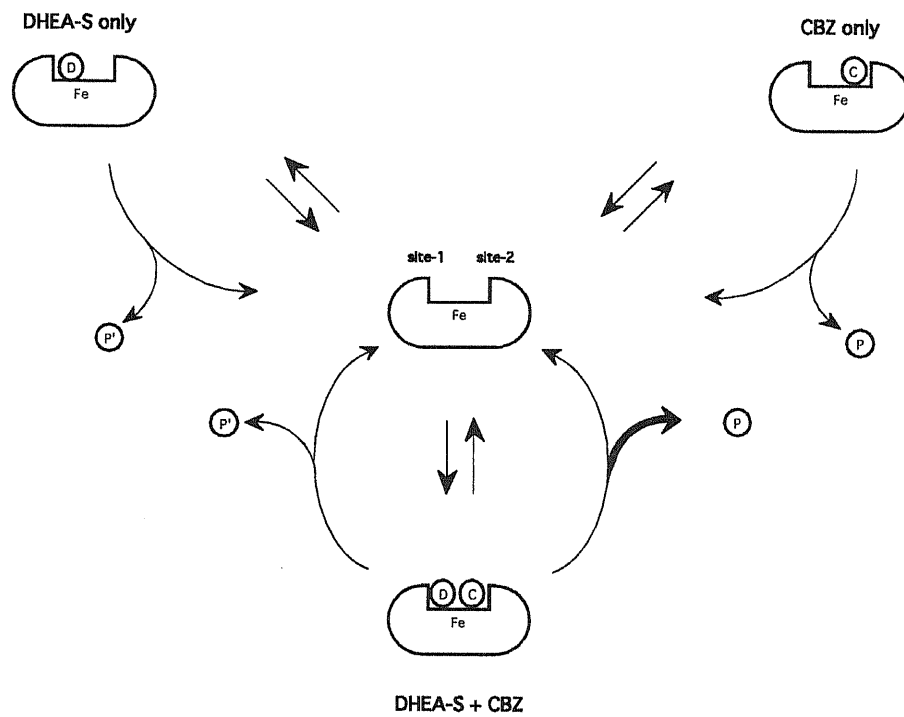
(B) ZNS



**Fig. 2-15 Kinetic scheme for the effect of AND and EST on CYP3A4-mediated CBZ 10,11-epoxidation (A) and the effect of AND on CYP3A4-mediated SMAP formation from ZNS (B).**

C, CBZ; A, AND; E, EST; Z, ZNS; P, CBZ 10,11-epoxide; P', SMAP.





**Fig. 2-16 Kinetic scheme for the effect of DHEA-S on CYP3A7-mediated CBZ 10,11-epoxidation.**

C, CBZ; D, DHEA-S; P, CBZ 10,11-epoxide; P', 16α-hydroxyDHEA-S.

## 第Ⅲ章 分子力場計算と密度汎関数理論を用いた解析

CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性は、CYP3A4 ではアンドロステジオンにより、一方 CYP3A7 では DHEA-S により顕著に活性化を受けた。その活性化の機序として、活性ポケット内での CBZ と内因性ステロイドの直接的な相互作用の可能性が考えられたため、ここでは、基質と内因性ステロイドが CYP3A4 あるいは CYP3A7 の活性ポケット内に同時に存在したと仮定し、そこで起こり得る分子間の相互作用について分子力場計算と密度汎関数理論を用いて検討を行った。

### 第 1 節 発現 CYP3A4 における検討

#### Ⅲ-1-1 実験方法

##### Ⅲ-1-1-a CYP3A4 のコンピューターモデリング法

CYP3A4 のコンピューターモデルは、Szklarz の方法 (40) に若干の変更を加えて構築した。

##### Ⅲ-1-1-b モデルへの基質のフィッティング法

CYP3A4 コンピューターモデルにフィッティングさせる CBZ 及びステロイドの安定な構造は Gaussian 98 (41) プログラムを用い、密度汎関数法により作成した。交換項には Becke の three parameter 式 (42) を、相関項には Lee-Yang-Parr の式 (43) を、基底関数系には 6-31G\*\*を用い、ポテンシャルエネルギー超曲面上における極小点の構造を十分最適化した。CBZ は、エポキシ化を受ける 10,11 位がヘムの第 6 配位子へ向くように配置し、分子力場計算によるエネルギー極小化計算を行うことでモデルの活性部位にフィッティングさせた。なお、分子力場計算には、AMBER 6.0 を用いた。

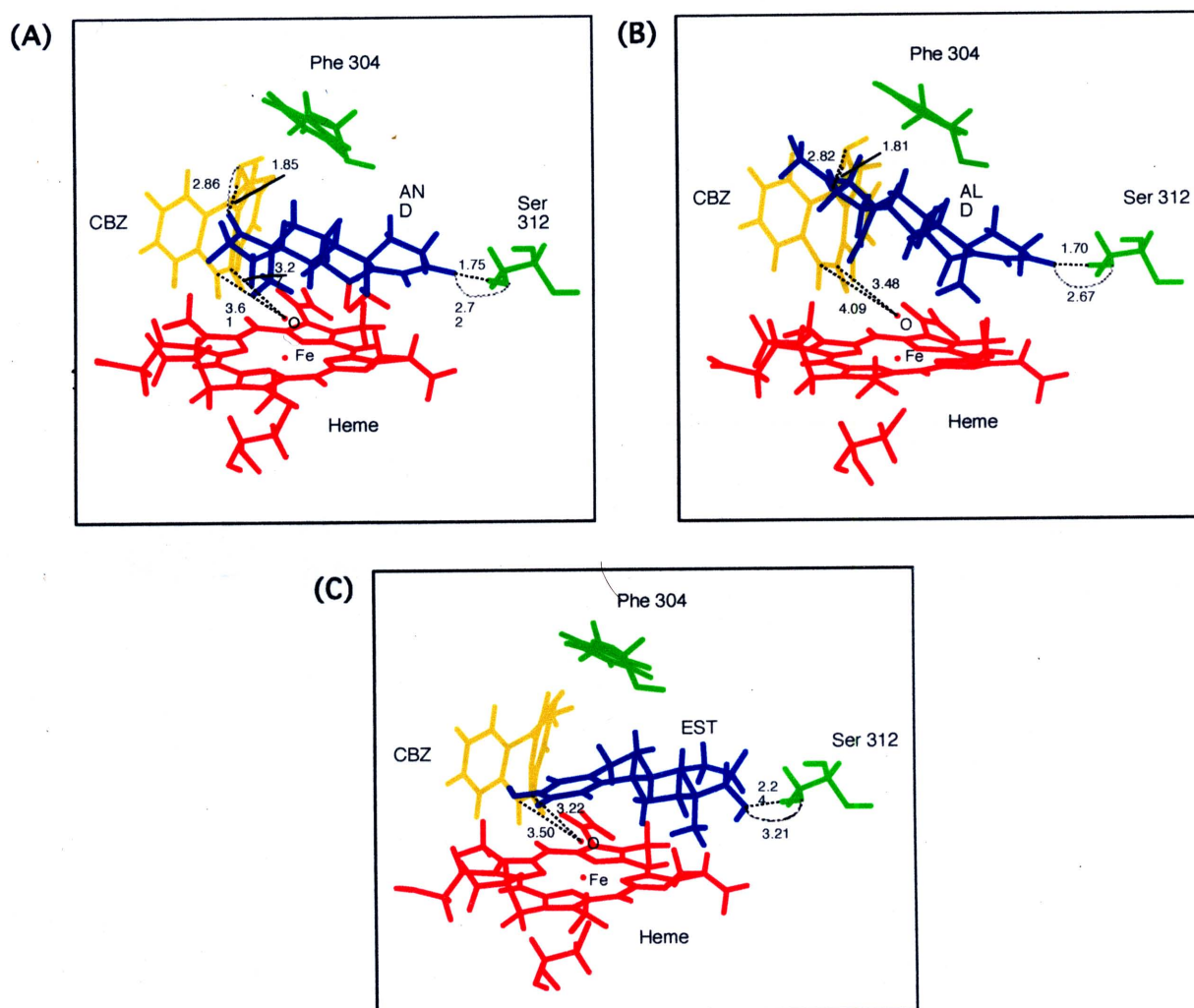
##### Ⅲ-1-1-c 内因性ステロイドと CBZ との密度汎関数理論による量子化学計算

内因性ステロイドと CBZ との相互作用の機序を明らかとするため、密度汎関数法を用いて相互作用エネルギーを求めた。交換項には Becke の three parameter 式 (42) を、相関項には Lee-Yang-Parr の式 (43) を、基底関数系には 6-31G\*\*を用いた。計算プログラムは Gaussian 98 (41) である。3-1-1-b で求めたフィッティング構造から CBZ および内因性ステロイドを抜き出し、両者が相互作用した状態と各々が単独に存在した状態についてそれぞれポテンシャルエネルギー計算を行い、それらを基に相互作用エネルギーを求めた。

#### Ⅲ-1-2 結果

CYP3A4 の活性部位が存在するとされるポケットに、基質である CBZ と内因性ステロイドが同時に存在していたときに起こり得る分子間の相互作用を分子力場計算と密度汎関数理論を用いて解析した。Fig. 3-1 (A)に示したように、活性ポケットに CBZ とアン

ドロステンジオンが同時に存在すると、CYP3A4 の 312 位の Ser の OH 基とアンドロステンジオンの A 環のカルボニル基とが水素結合を起こし、アンドロステンジオンが保持されると考えられた。また、CBZ のカルボン酸アミドとアンドロステンジオンの D 環のカルボニル基とが水素結合することが示唆された。これらの結合によって CBZ が安定に保持され、ヘムに結合している酸素原子と CBZ の 10,11 位の C-C (被エポキシ部位) との相互作用が保たれやすくなり、エポキシ化を受けやすくなると推察された。一方、アルドステロンと CBZ が同時に存在したときは、Ser 312 との距離は保たれるが、アルドステロンの D 環の側鎖が長いため、被エポキシ部位とヘムに結合している酸素原子との相互作用がやや弱くなると考えられた (Fig. 3-1 (B))。また、エストラジオールと CBZ が同時に存在したときは、Ser 312 とエストラジオールとの水素結合が切れるため、エストラジオールが動きやすくなり、CBZ とエストラジオールとの相互作用が弱くなったことが示唆された (Fig. 3-1 (C))。

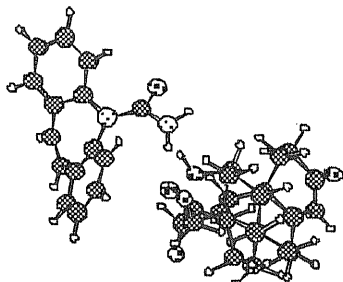
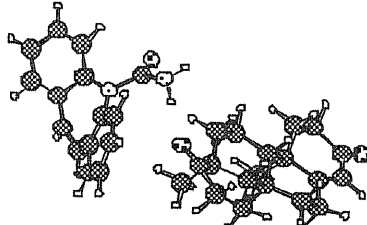
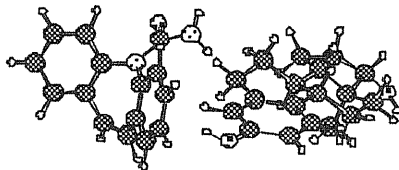


**Fig. 3-1 Proposed interaction between CBZ and steroids in the active site of CYP3A4 model.**

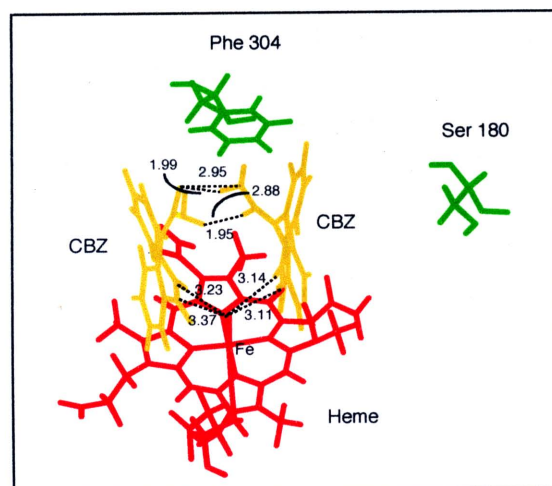
CBZ docked into the active site of CYP3A4 in an orientation conducive to its 10,11-epoxidation. (A) Interaction between CBZ and AND, (B) Interaction between CBZ and ALD, (C) Interaction between CBZ and EST. The heme group is shown in red. CBZ is shown in yellow. AND, ALD and EST are shown in blue. Phe 304 and Ser 312 are shown in green.

活性ポケット内において、基質とステロイドが相互作用していない状態と相互作用している状態のポテンシャルエネルギーの差を、密度汎関数法により算出した安定化エネルギーを Table. 3-1 に示した。アンドロステンジオン添加時の安定化エネルギーは、アルドステロン、エストラジオールと比較して高値を示した。

**Table 3-1 Proposed interaction between carbamazepine and endogenous steroids.**

Endogenous steroids	<i>In vitro</i> data	Stabilization energy (kcal/mol)	Interaction
ALD	±	2.89	
AND	+++	6.03	
EST	±	2.68	

次に、活性ポケット内に CBZ が2つ同時に存在したときに起こり得る相互作用について、分子力場計算と密度汎関数理論を用いて解析した。この結果、Fig. 3-2 に示すように CBZ のカルボン酸アミド同士が水素結合することで、安定に保持されることが明らかになった。CBZ が2つ存在すると、これらの基質間に2つの水素結合をつくることでダイマーとなり安定化される。このときの安定化エネルギーは 12.6 kcal/mol であった。従って、CBZ は高基質濃度下において2つの CBZ 同士が水素結合することにより、低基質濃度下よりも安定に保持され、代謝されやすくなることが推察された。この結果、CBZ の kinetic はシグモイド様曲線になる可能性が示唆された。



Stabilization energy 12.6 (kcal/mol)

**Fig. 3-2 Proposed interaction between CBZ and CBZ in the active site of CYP3A4 model.**

CBZ docked into the active site of CYP3A4 in an orientation conducive to its 10,11-epoxidation. The heme group is shown in red. CBZ is shown in yellow. Ser 180 and Phe 304 are shown in green.

## 第2節 発現 CYP3A7 における検討

### Ⅲ-2-1 実験方法

#### Ⅲ-2-1-a CYP3A7 のコンピューターモデリング法

CYP3A7 のコンピューターモデルは、Szklarz が求めた CYP3A4 (40) を基に構築した。CYP3A7 と CYP3A4 のアラインメントには HOMOLOGY を用いた。CYP3A4 のコンピューターモデルをもとに Modeller program を用いて CYP3A7 のモデルの座標を計算したものを CYP3A7 のコンピューターモデルとした。

#### Ⅲ-2-1-b モデルへの基質のフィッティング

CYP3A7 コンピューターモデルにフィッティングさせる DHEA 及び DHEA-3S の安定な構造は Gaussian 98 (41) プログラムを用い、密度汎関数法により作成した。交換項には Becke の three parameter 式 (42) を、相関項には Lee-Yang-Parr の式 (43) を、基底関数系には 6-31G\*\*を用い、ポテンシャルエネルギー超曲面上における極小点の構造を十分最適化した。DHEA 及び DHEA-3S はその 16 $\alpha$  位の水素原子がヘムの第6配位子へ向くように配置し、分子力場計算によるエネルギー極小化計算を行うことでモデルの活性部位にフィッティングさせた。

#### Ⅲ-2-1-c 内因性ステロイドとカルバマゼピンの密度汎関数理論による量子化学計算

3-1-1-c に準じた方法で、計算を行った。

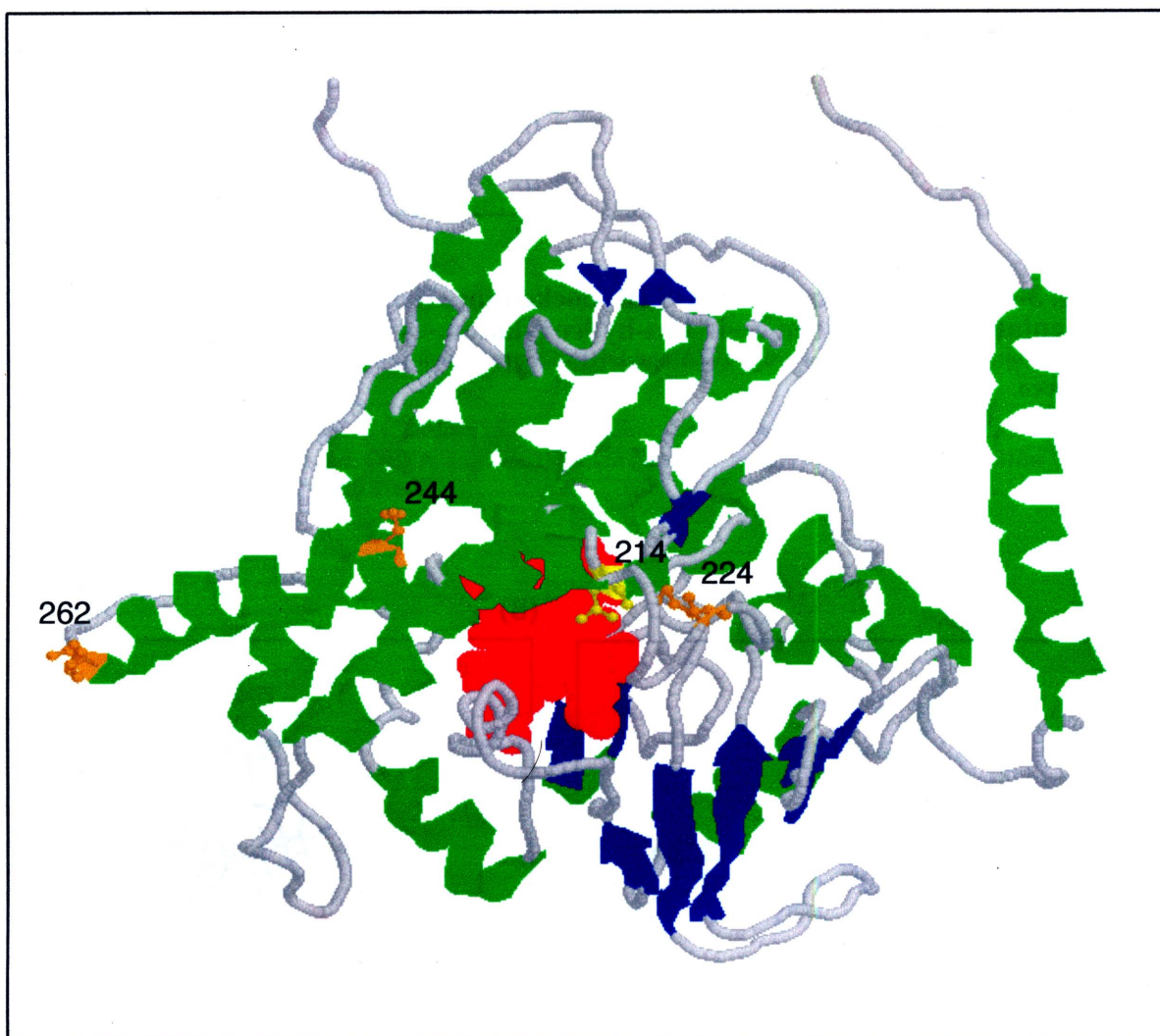
### Ⅲ-2-2 結果

CYP3A4 のコンピューターモデルをもとに構築した CYP3A7 のコンピューターモデルを Fig. 3-3 に示した。本モデルに基質として DHEA、DHEA-S を最も安定な配置にフィッティングさせた状態を Fig. 3-4 に示した。DHEA および DHEA-S は共に、Ser 180 と水素結合により安定に保持された。また、ヘムに結合している酸素原子と DHEA の 16 $\alpha$  位の C-H との距離は O-C が 3.2Å、O-H が 2.4Å、DHEA-S の 16 $\alpha$ 位の C-H との距離は O-C が 3.4Å、O-H が 2.4Å であり、ほぼ同じであった。

次に、CYP3A7 の活性ポケットに DHEA あるいは DHEA-S と CBZ が同時に存在したときに起こり得る相互作用を分子力場計算と密度汎関数法により解析した。その結果、Fig. 3-5 に示したように、DHEA、DHEA-S が安定に代謝される配置をとった時、CBZ の存在時には、ヘムに結合している酸素原子と DHEA の 16 $\alpha$ 位の C-H との距離は O-C が 3.6Å、O-H が 2.8Å であり、DHEA-S の 16 $\alpha$ 位の C-H との距離は O-C が 3.5Å、O-H が 2.5Å となり、CBZ が存在しない時 (Fig.3-4) の距離とほぼ同じであった。従って、DHEA、DHEA-S の 16 $\alpha$ 位の C-H とヘムに結合している酸素原子との距離は、CBZ 存在時と非存在時でほとんど変化しないことが示された。それゆえ CBZ は、DHEA あるいは DHEA-S の代謝にほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。

一方、CBZ が安定に代謝される配置をとった時、Fig. 3-6 に示したように、DHEA-S の3位の硫酸基と CBZ のカルボン酸アミドが水素結合以上の相互作用をすることで安定

に保持されることが示された。このときの安定化エネルギーは、14.3 kcal/mol であった。DHEA は3位に硫酸基を持たないため、CBZ との相互作用が弱く、その安定化エネルギーは 3.7 kcal/mol であった。この結果、CYP3A7 による CBZ エポキシ化反応は3位に硫酸基を有する DHEA-S の添加時にのみ活性上昇が見られ、DHEA 添加による影響は小さかったことが示唆された。

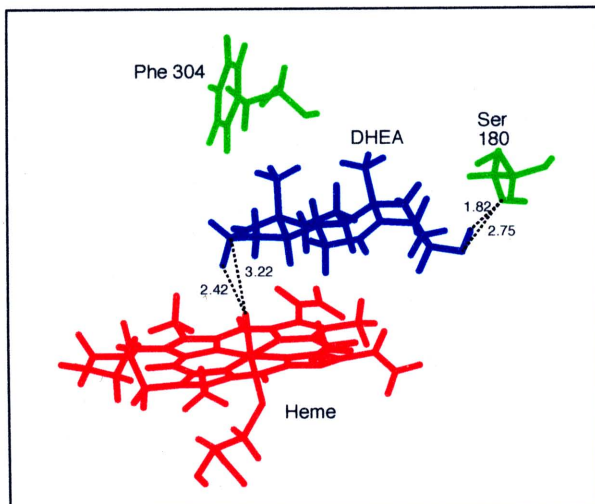


**Fig. 3-3 Three dimensional structure of CYP3A7 by computer modeling.**

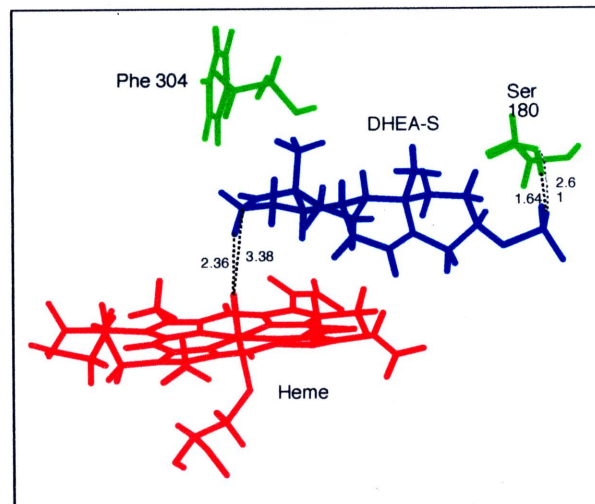
This structure is illustrated from the sixth ligand of heme. The center of this structure may be an entrance of substrate. The heme group is shown in red.  $\alpha$ -helix is shown in green.  $\beta$ -sheet is shown in blue. Lys 224, Lys 244 and Lys 262 are shown in orange. Asn 214 is shown in yellow.



(A)



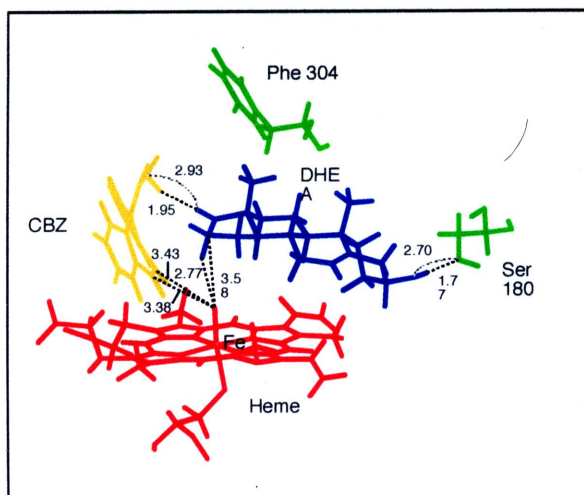
(B)



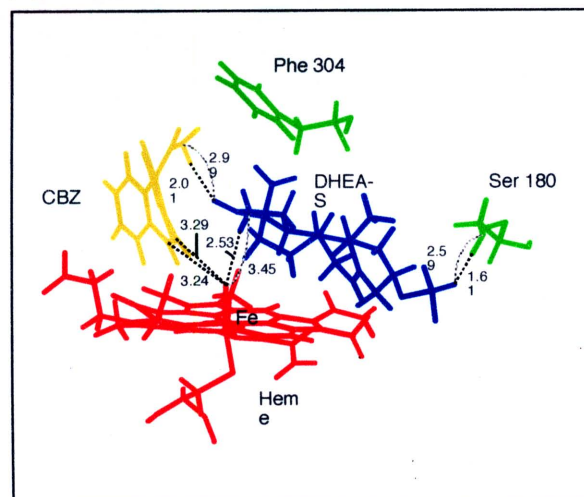
**Fig. 3-4 DHEA (A) and DHEA-S (B) docked into the active site of CYP3A7 in an orientation conducive to their 16 $\alpha$ -hydroxylation.**

The heme group is shown in red. DHEA and DHEA-S are shown in blue. Phe 304 and Ser 180 are shown in green.

(A)



(B)

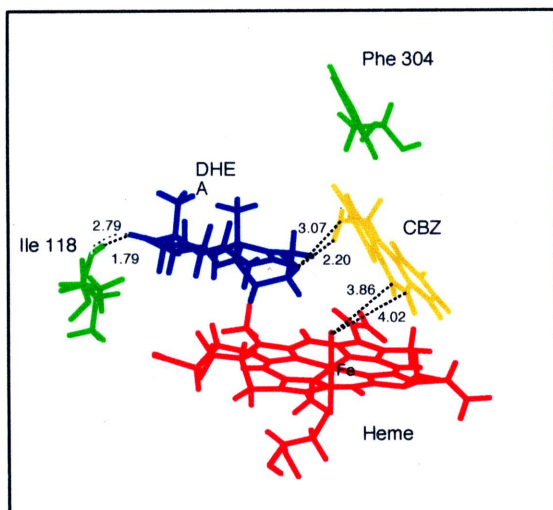


**Fig. 3-5 Proposed interaction between CBZ and DHEA (A), DHEA-S (B) in the active site of CYP3A7.**

DHEA and DHEA-S docked into the active site of CYP3A7 in an orientation conducive to their 16 $\alpha$ -hydroxylation. The heme group is shown in red. DHEA and DHEA-S are shown in blue. CBZ is shown in yellow. Ser 180 and Phe 304 are shown in green.

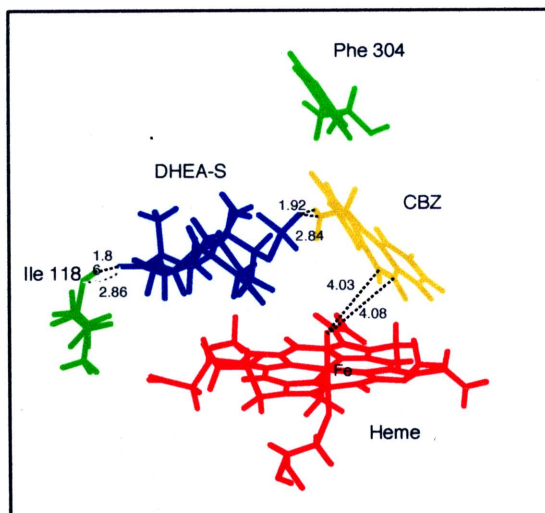


(A)



Stabilization energy 3.7 kcal/mol

(B)



Stabilization energy 14.3 kcal/mol

**Fig. 3-6 Proposed interaction between CBZ and DHEA (A), DHEA-S (B) in the active site of CYP3A7.**

CBZ docked into the active site of CYP3A7 in an orientation conducive to its 10,11-epoxidation. The heme group is shown in red. DHEA and DHEA-S are shown in blue. CBZ is shown in yellow. Ile 118 and Phe 304 are shown in green.

### 第3節 考 察

本章では、基質と内因性ステロイドが CYP3A4 あるいは CYP3A7 の活性ポケット内に同時に存在したと仮定し、そこで起こり得る分子間の相互作用について分子力場計算と密度汎関数理論を用いて検討を行った。

CYP3A4 においては、Fig. 3-1 に示したように、アンドロステンジオンと CBZ との間に水素結合が生じることでこれらが安定に保持され、CBZ エポキシ化の触媒効率が上昇することが示唆された。一方、エストラジオールについては、CBZ との相互作用は弱く、影響を及ぼさないことが推察された。また、アルドステロンはD環の側鎖が長いため、CBZ の非エポキシ部位とヘムに結合している酸素原子との相互作用がやや弱くなると考えられた。Table. 3-1 より、安定化エネルギーは、アンドロステンジオン添加時にアルドステロン、エストラジオール添加時と比較して高くなることが示された。以上のことから、アンドロステンジオン添加時には CBZ の代謝触媒効率が上昇し、アルドステロン、エストラジオール添加時には影響が小さかったと考えられた。さらに、CBZ と CBZ の相互作用について分子力場計算と密度汎関数理論を用いて検討した結果、Fig. 3-2 に示すように、CBZ のカルボン酸アミド同士が水素結合することで安定化していることが明らかになった。このときの安定化エネルギーは、12.6 kcal/mol であった。このことから、CBZ は低基質濃度下においては、活性ポケット内で相互作用する頻度が低く、高基質濃度になると、CBZ 同士が水素結合することでダイマーとなる確率が増加し、被エポキシ部位が安定に保持され代謝されやすくなることが示された。この結果、CBZ の kinetic がシグモイド様曲線になる可能性が示唆された。

次に、CYP3A7 のコンピューターモデル (Fig. 3-3) を用いて、CYP3A7 に特異性の高い基質である DHEA、DHEA-S を単独で CYP3A7 の活性ポケット内にフィッティングさせた結果、活性ポケット内での配位に大差はなかった (Fig. 3-4)。さらに、CYP3A7 の活性ポケットに DHEA あるいは DHEA-S と CBZ が同時に存在したときに起こり得る相互作用を分子力場計算と密度汎関数法により解析したところ、Fig. 3-5 に示すように、DHEA、DHEA-S の 16 $\alpha$ 位の C-H とヘムに結合している酸素との距離は、CBZ 存在時と非存在時 (Fig. 3-4) でほとんど変化しないことが明らかとなった。すなわち、CBZ の存在は DHEA、DHEA-S の代謝にほとんど影響を与えないことが示唆された。また、この DHEA、DHEA-S の 16 $\alpha$ 位の C-H とヘムに結合している酸素との距離は、CBZ の被エポキシ化部位とヘムに結合している酸素との距離とほぼ同じであった (Fig. 3-5)。このことから、まず活性ポケット内に DHEA、DHEA-S が先に入り、安定に 16 $\alpha$ 位が代謝される配置をとったときには、CBZ のエポキシ化反応と DHEA、DHEA-S の 16 $\alpha$ 水酸化反応は競合反応となり、活性化エネルギーの小さい方が代謝を受けやすくなると考えられた。一般的に、CYP による一酸素原子添加機構における二段階反応では、ヘムの第6配位座に結合している酸素原子はフリーラジカルの性質を有している。フリーラジカルは炭化水素に対し水素原子を引き抜くことが知られており、基質からの水素引き抜き反応の活性化エネルギーは、15.5 kcal/mol である (44)。一方、CYP によるエポキシ化反応には様々な反応機構が提唱されており (45)、その反応には二重項状態と四重項状態の関与が示唆されている。この反応の律速段階における活性化エネルギーはそれぞれ、二重項状態では 42.68 kcal/mol、四重項状態では 22.63 kcal/mol であった (46) こと

から、水酸化反応とエポキシ化反応を比較すると、水酸化反応の方が進行しやすいと考えられる。従って、DHEA、DHEA-S の 16 $\alpha$ 水酸化反応と CBZ エポキシ化反応では、16 $\alpha$ 水酸化の方が  $V_{max}/K_m$  値が CBZ エポキシ化よりも大きくなり、代謝されやすいことが示唆された。

CYP3A7 による CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性は 3 位に硫酸基をもつステロイドにより顕著に活性化させたが、その理由として、硫酸基を持つステロイドが外側に位置する 224、244、262 位のいずれかのリジンに引きつけられることでコンフォメーション変化が起こり、CBZ が酵素の内側に入る確率が上がることが考えられた。CYP3A7 が CYP3A4 と比較して基質特異性が狭いのは、この外側のアミノ酸が影響している可能性が考えられる。その一方で、Fig. 3-6 に示したように、酵素の活性ポケット内における基質同士の相互作用による寄与も考えられる。すなわち、CBZ が安定に代謝される配置をとったときには、CBZ のカルボン酸アミドとステロイドの 3 位の硫酸基とが水素結合以上の相互作用をすることで安定化し、CBZ の代謝活性が上昇したと考えられる。このことから、CYP3A7 による CBZ エポキシ化の活性変化の機序は、CYP3A4 の時と同様な、活性ポケット内の相互作用の寄与だけで説明できる場合と、説明できない場合がある。説明できない原因としては、CYP3A7 の特徴的なアミノ酸であるリジンが基質の入り口付近に位置すること、また、基質特異性に重要だと考えられるアミノ酸が、外側に存在していることなどが挙げられる。それゆえ、CYP3A4 の場合とは異なり、活性ポケット内の基質分子間相互作用の寄与だけではなく、外側の CYP3A7 に特徴的なアミノ酸の寄与も考慮に入れる必要性が示された。

## 第IV章 出生後の尿中ステロイド代謝物の変動

前章までの結果より、CYP3A4 と CYP3A7 では薬物、内因性ステロイド代謝における基質特異性が異なること、さらに、内因性ステロイド添加による活性変化にも差異が認められることが明らかとなった。出生後数週間は CYP3A7 から CYP3A4 への変換が起こっている時期と考えられ、CYP3A による薬物代謝能は大きく変動するものと考えられる。そこで、本章では、出生後の CYP3A7 から CYP3A4 への変換が如何に起こっているかについて検討を行う目的で、新生児期の尿中ステロイド代謝物の経日的変化を追うこととした。すなわち、CYP3A 活性の指標として尿中 6 $\beta$ -水酸化コルチゾール/コルチゾール (6 $\beta$ -OHF/C) 比を、CYP3A7 活性の指標として尿中 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA/クレアチニン (CRE) 比を用い、出生後経日的に測定を行い、CYP3A7 と CYP3A4 活性が出生後如何に変化するかについて検討を行った。さらに、出生後の CYP3A7 および CYP3A4 活性の変化により、各種薬物代謝活性が如何に変化するかについて考察を行った。

### 第 1 節 尿中 6 $\beta$ -水酸化コルチゾール/コルチゾール比の出生後の変動

本節では、まず出生時の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比を規定する要因を明らかとする目的で、在胎週齢、体重、性別、出産方法の異なる多数の新生児の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比の測定を行い比較検討した。次に、出生後経日的に採尿を行い、出生後の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比の変動について検討を行った。

#### IV-1-1 実験方法

##### IV-1-1-a 実験材料および試薬

君津中央病院新生児科の未熟児を含む新生児 122 名および千葉大学医学部附属病院産婦人科にて満期正常分娩で出生した男児新生児 56 名とその母親 17 名、非妊娠健常成人女性より採尿を行った。君津中央病院の新生児のうち、出生当日の採尿が可能であった新生児の背景を Table 4-1 に、出生後の経日採尿を行った新生児の背景を Table 4-2 に示した。また、千葉大学医学部附属病院の新生児と母親、対照とした非妊娠健常成人女性の背景を Table 4-3 に示した。なお、君津中央病院の新生児は何らかの問題（発育不全、感染症等）を持つ者であるが、CYP3A 酵素活性に影響を及ぼすことが知られている薬物が使用された者は除外した。

採尿ポイントは、新生児は午前中の初尿とし、君津中央病院においては、出生当日および出生後 1、2、3、5、7、14 日目に、千葉大学医学部附属病院においては、出生当日および出生後 1、2、3、5、7 日目に行った。また、母親の採尿は出産後 2 時間、非妊娠健常成人女性は午前中の初尿とした。なお、本検討は千葉大学医学部倫理委員会の承認を得ており、採尿は母親の同意を得た上で行った。

試薬類は、前章までに用いたものと同様のものを使用した。

**Table 4-1 Details of the neonates participating in the measurement of the urinary 6 $\beta$ -OHF/C ratio on their day of birth**

	Number of premature subjects			Number of mature subjects		
	Cesarean birth	Vaginal birth	Total	Cesarean birth	Vaginal birth	Total
Male	17	10	27	9	14	23
Female	20	9	29	7	8	15

Mature subjects, gestational ages are over 37 weeks; premature subjects, gestational ages are under 37 weeks. Samples were obtained from Kimitsu Chuo Hospital.

**Table 4-2 Details of the neonates participating in the study to clarify postnatal changes in the urinary 6 $\beta$ -OHF/C ratio**

	Number of premature subjects			Number of mature subjects		
	Cesarean birth	Vaginal birth	Total	Cesarean birth	Vaginal birth	Total
Male	16	9	25	10	19	29
Female	13	4	17	5	5	10

Mature subjects, gestational ages are over 37 weeks; premature subjects, gestational ages are under 37 weeks. Samples were obtained from Kimitsu Chuo Hospital.

**Table 4-3 Detail of full term normal delivery neonates, their mothers and healthy young female volunteers**

	Numbers	Age (years)	Gestational age (weeks)	Body weight (g)
Neonates	56		39.3 $\pm$ 1.3	3201 $\pm$ 348
Neonates (paired with mother)	17		39.5 $\pm$ 1.2	3311 $\pm$ 398
Mothers	17	31.6 $\pm$ 5.5		
Female volunteers (without pregnancy)	24	24.6 $\pm$ 6.5		

Samples were obtained from Chiba University Hospital.

#### IV-1-1-b 尿中 6 $\beta$ -水酸化コルチゾールの定量法

尿サンプルからの 6 $\beta$ -OHF の抽出は Joellenbeck らの方法 (47) を一部改変して行った。

尿サンプル 5 mL をとり、0.1 N HCl にて pH 4.0 に調製後、無水硫酸ナトリウム 1 g を加え溶解した。酢酸エチル 15 mL を加え 5 分間振倒混和し、3,000 rpm で 5 分間遠心分離後、酢酸エチル層を別の試験管に移した。0.25 N 水酸化ナトリウム/飽和硫酸ナトリウム溶液 1 mL にて酢酸エチル層を 2 回洗浄後、酢酸エチル層 10 mL を別の試験管に移し、減圧下蒸発乾固した。残渣に分析用溶離液 200  $\mu$ L を加え溶解したものを HPLC 用試料とし、40  $\mu$ L を HPLC へ注入した。

HPLC システムおよび HPLC 条件は、カラムの洗浄時間を 40 分間とした以外は 1-1-1-h に記載したものと同条件にて行った。

#### IV-1-1-c 尿中コルチゾールの定量法

尿サンプルからのコルチゾールの抽出は Samaan らの方法 (48) を一部改変して行った。

尿サンプル 3 mL に、内部標準物質 (2  $\mu$ g/mL デキサメタゾン/メタノール溶液) 50  $\mu$ L、クロロホルム 6 mL を加え 5 分間振倒混和し、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上層を除去後、0.3 N 水酸化ナトリウム 6 mL にてクロロホルム層を 2 回洗浄し、クロロホルム層を別の試験管に移し、減圧下蒸発乾固した。残渣に 50% メタノール 200  $\mu$ L を加え溶解したものを HPLC 用試料とし、40  $\mu$ L を HPLC へ注入した。

HPLC システムは、尿中 6 $\beta$ -OHF の測定と同様のシステムを用いた。カラムは Inertsil ODS-3 (粒径 5  $\mu$ m、4.6 $\times$ 250 mm、ジーエルサイエンス) を用い、カラムは室温で使用した。分析用溶離液として、30 % アセトニトリルを脱気して用い、流速は 1.0 mL/分とした。カラムに残る物質を洗い流す目的で 25 分より溶離液を 70 % アセトニトリルに切り換え 20 分間カラムを洗浄した。その後分析用溶離液に戻し、さらに 20 分間カラムを洗浄、平衡化した。検出波長は 247 nm で行った。本条件にて、コルチゾールは約 13 分、内部標準物質は約 26 分に溶出した。

#### IV-1-1-d データ解析法

相関係数は、直線回帰分析により算出した。出生時の新生児と母親の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比の有意差検定は paired t-検定で、その他の検定は unpaired t-検定で行った。なお、群間の分散に有意差が認められた場合の検定はノンパラメトリック (Wilcoxon) 検定で行い、危険率 5 %以下を有意差有りとした。データ解析には統計ソフト StatView 4.0 (Abacus concept, CA, USA) を使用した。

### IV-1-2 結果

#### IV-1-2-a 出生時の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比

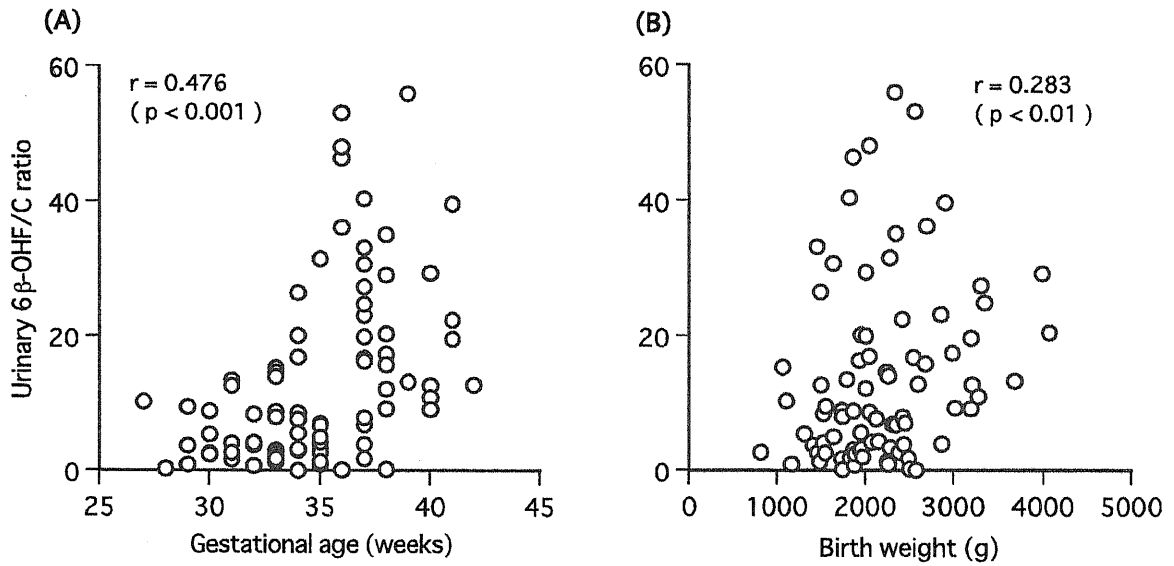
Fig. 4-1 に君津中央病院のサンプルにおける出生当日の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比と在胎週齢、体重の関係を示した。出生当日の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比は、在胎週齢、体重との間で有意な正の相関を示し、特に在胎週齢との間で高い相関 ( $r=0.476$ ,  $P<0.001$ ) を示した。

Fig. 4-2 に性別、出産方法別での尿中  $6\beta$ -OHF/C 比の比較を示した。出生当日の尿中  $6\beta$ -OHF/C 比は性別（男児;  $13.8 \pm 1.6$ , 女児;  $13.9 \pm 2.2$ ）、出産方法（帝王切開;  $12.7 \pm 1.7$ , 経膣出産;  $15.3 \pm 2.2$ ）の違いによる差は認められなかった。

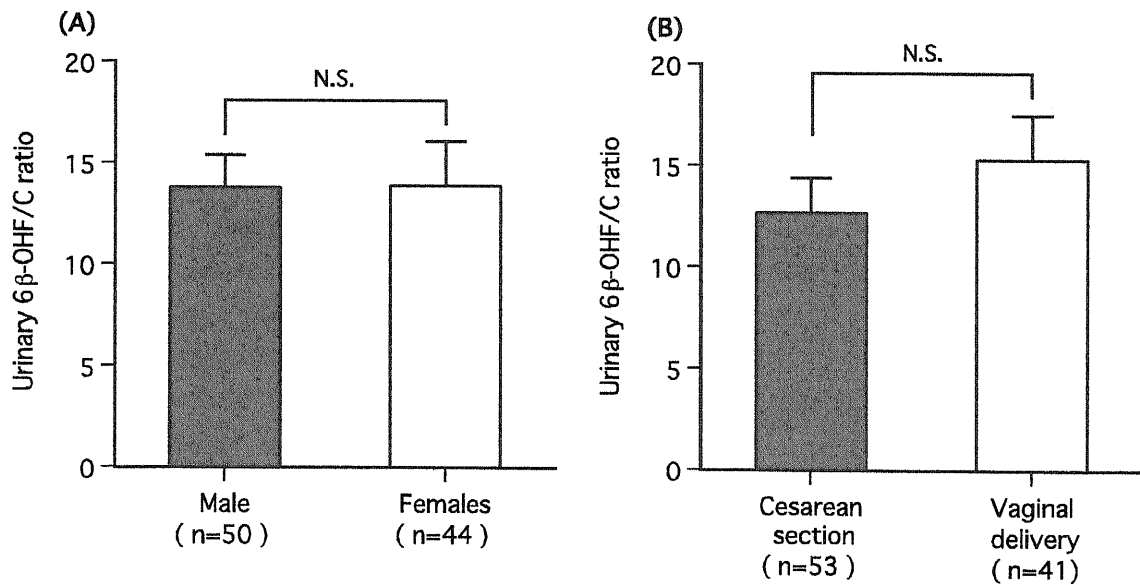
Fig. 4-3 に千葉大学医学部附属病院のサンプルで、出生当日の新生児とその母親の出産後 2 時間の尿が同時に得られたものの尿中  $6\beta$ -OHF/C 比を示した。全例とも、新生児の尿中  $6\beta$ -OHF/C 比はその母親よりも高値を示し、paired t-test により有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められた。一方、非妊娠健常成人女性の尿中  $6\beta$ -OHF/C 比は母親よりもやや高値を示したが、両群間に有意差は認められなかった。

#### IV-1-2-b 出生後の尿中 $6\beta$ -OHF/C 比の変動

Fig. 4-4 に出生後の尿中  $6\beta$ -OHF/C 比の経日変化を示した。君津中央病院サンプルの在胎週齢 37 以上は、在胎週齢 37 未満に比べ出生当日の尿中  $6\beta$ -OHF/C 比は高値を示し、出生後経日的な低下が認められた。一方、在胎週齢 37 未満では出生当日の尿中  $6\beta$ -OHF/C 比は低値をとり、出生後 14 日まで経日的な変化は認められなかった。また、全例満期正常分娩である千葉大学病院医学部附属病院のサンプルは、ほぼ君津中央病院の在胎週齢 37 以上と同様の変化を示した。

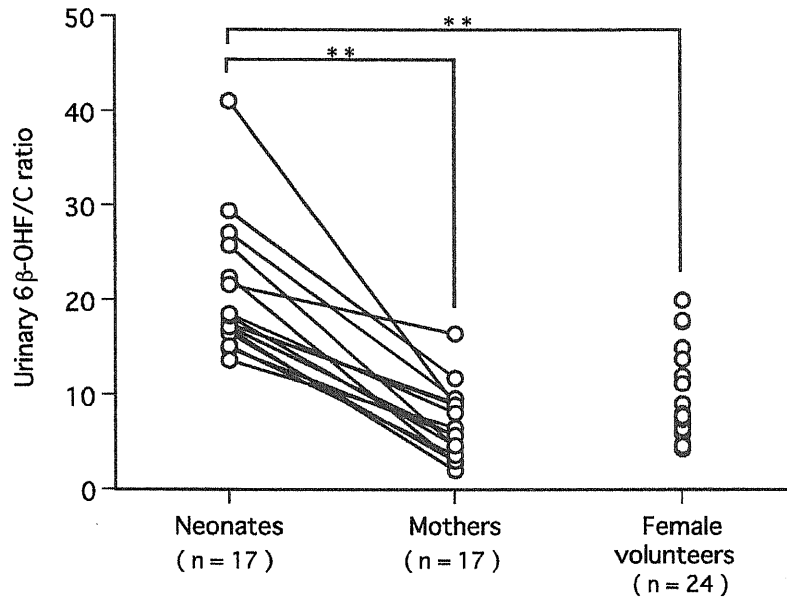


**Fig. 4-1 Correlation between urinary 6β-OHF/C ratio and gestational age (A) and birth weight (B) in the neonates (n=94) on day of birth.**  
 Samples were obtained from Kimitsu Chuo Hospital. The data were calculated using linear regression analysis.



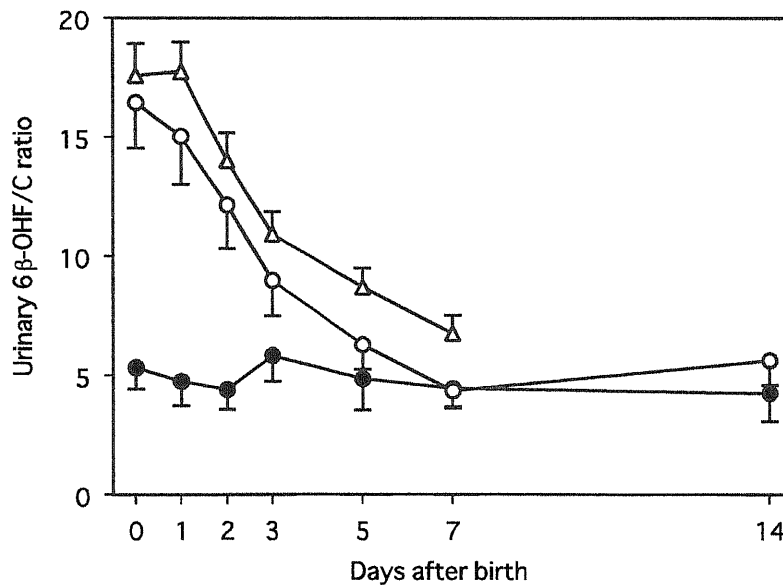
**Fig. 4-2 Comparison of urinary 6β-OHF/C ratio between male and females (A), cesarean section and vaginal delivery (B).**  
 Samples were obtained from Kimitsu Chuo Hospital. Data was shown as mean ± S.E..





**Fig. 4-3 Comparison of urinary 6β-OHF/C ratio between mature male neonates with normal delivery, their mothers, and healthy female volunteers without pregnancy.**

Samples were obtained from Chiba University Hospital. Urine was collected within 24 h after birth in neonates, 2 h after delivery in their mothers, and in the morning in female volunteers. \*\*  $p < 0.01$  compared with neonates.



**Fig. 4-4 Comparison of changes in urinary 6β-OHF/C ratio after birth between mature and premature neonates.**

Data was shown as mean ± S.E..

△, Full term normal delivery (obtained from Chiba University Hospital, n=56)

○, Gestational age more than 37 weeks (obtained from Kimitsu Chuo Hospital, n=39)

●, Gestational age under 37 weeks (obtained from Kimitsu Chuo Hospital, n=42)

## 第2節 尿中 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA/クレアチニン比の出生後の変動

本節では、CYP3A7 活性の指標として尿中 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比を用い、出生後の CYP3A7 活性の変化について検討を行った。

### IV-2-1 実験方法

#### IV-2-1-a 実験材料および試薬

対象は、千葉大学医学部附属病院産婦人科で満期正常分娩にて出生した新生児である (Table 4-3)。

試薬類は前章までに用いたものと同様のものを使用した。

#### IV-2-1-b 尿中 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA の定量法

尿中 DHEA 16 $\alpha$ -水酸化体は、スルファターゼにて脱硫酸抱合処理を行い、抱合体、非抱合体の総量として測定を行った。

尿サンプル 1 mL に 2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.2) 1 mL およびスルファターゼ (500 unit) を加え、37 °C、24 時間脱硫酸抱合処理を行った。脱硫酸抱合処理後、酢酸エチル 5 mL を加え 10 分間振倒混和し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。酢酸エチル層 4 mL を別の試験管に移し、減圧下蒸発乾固した。その後は、DHEA 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性測定法と同様の操作 (1-1-1-i) にて蛍光誘導体化処理を行い、蛍光検出器付き HPLC にて定量を行った。

#### IV-2-1-c 尿中クレアチニンの定量法

尿中クレアチニンは、Paroni らの方法 (49) により行った。

20~50 倍に希釈した尿サンプル 100  $\mu$ L をマイクロチューブにとり、内部標準物質 (100  $\mu$ g/mL シメチジン/10 mM HCl) 10  $\mu$ L およびアセトン 400  $\mu$ L を加え、10 秒間ボルテックスミキサーにて混和し、12,000 rpm で 4 分間遠心分離した。上層 300  $\mu$ L を別のマイクロチューブに移し、減圧下蒸発乾固した。残渣に分析用溶離液 100  $\mu$ L を加え溶解したものを HPLC 用試料とし、20  $\mu$ L を HPLC へ注入した。

HPLC システムは、CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性測定で用いたものと同様のシステムを用いた。カラムは Inertsil ODS-2 (粒径 5  $\mu$ m、4.6 $\times$ 150 mm、ジーエルサイエンス) で室温で使用した。分析用溶離液として 10 mM デカン sulfon 酸 (pH 3.2) : メタノール=1 : 1 の割合で混合したものを脱気して用い、流速は 0.7 mL/分とした。検出波長は 236 nm で行った。本条件にてクレアチニンは約 9 分、内部標準物質は約 13 分に溶出した。

### IV-2-2 結果

Table 4-4 に満期正常分娩にて出生した新生児の出生後の尿中 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA、CRE 濃度および尿中 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比の経日変化を示した。尿中 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比は出生後、尿中 6 $\beta$ -OH/C 比同様経日的な減少が認められた。また、7

日目までの低下率も尿中 6 $\beta$ -OH/C 比とほぼ同様であった。

**Table 4-4 Changes in urinary concentration of 16 $\alpha$ -OH DHEA, CRE and 16 $\alpha$ -OH DHEA/CRE ratio after birth in full term normal delivery neonates**

Days after birth	16 $\alpha$ -OH DHEA ( $\mu$ M)	CRE (mM)	16 $\alpha$ -OH DHEA/CRE ratio ( $\times 10^3$ )	n
0	58.5 $\pm$ 11.64	13.3 $\pm$ 5.12	8.8 $\pm$ 1.60	20
1	55.8 $\pm$ 9.20	10.5 $\pm$ 2.38	10.4 $\pm$ 1.96	35
2	33.5 $\pm$ 5.10	10.4 $\pm$ 3.02	7.1 $\pm$ 1.12	37
3	14.8 $\pm$ 2.24	4.8 $\pm$ 0.99	5.6 $\pm$ 0.85	42
5	9.0 $\pm$ 1.44	3.1 $\pm$ 0.73	5.5 $\pm$ 0.86	40
7	3.6 $\pm$ 1.03	1.5 $\pm$ 0.28	3.0 $\pm$ 0.87	22

Data was shown as mean  $\pm$  S.E.,  
Samples were obtained from Chiba University Hospital.

### 第3節 尿中ステロイド代謝物の出生後1年間の変動

第1節、第2節において尿中  $6\beta$ -OHF/C 比および  $16\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比の出生後 1~2 週間までの経日変化について検討を行った。本節では 1 名の新生児について 1 年間にわたり、これら尿中ステロイド代謝物の測定を経時的に行い、CYP3A4 および CYP3A7 活性の長期的な変化について検討を行った。

#### IV-3-1 実験方法

##### IV-3-1-a 実験材料および試薬

対象は千葉大学医学部附属病院にて出生の女児 1 名（在胎週齢 39、出生時体重 2,625 g）およびその母親（年齢 27 歳）である。子供は出生から 1 年間にわたり経時的（出生当日、1、2、3、4、6、14、21、28、35、56、140、168、181、196、252、301、329、364 日目）に採尿を行った。母親は妊娠 35、37、38、39 週目に採尿を行った。なお、対象児は 252 日目前後に上気道炎に罹患、アモキシシリン、カルボシステイン、マレイン酸クロルフェニラミンが数日間投与された。さらに、345~379 日目にかけて、熱性けいれんに対しフェノバルビタールが投与された。

##### IV-3-1-b 尿中ステロイドおよびその代謝物の定量法

尿中  $6\beta$ -OHF、コルチゾール、尿中  $16\alpha$ -水酸化 DHEA および CRE の定量は第 IV 章、第 1 節、2 節と同様の方法で行った。

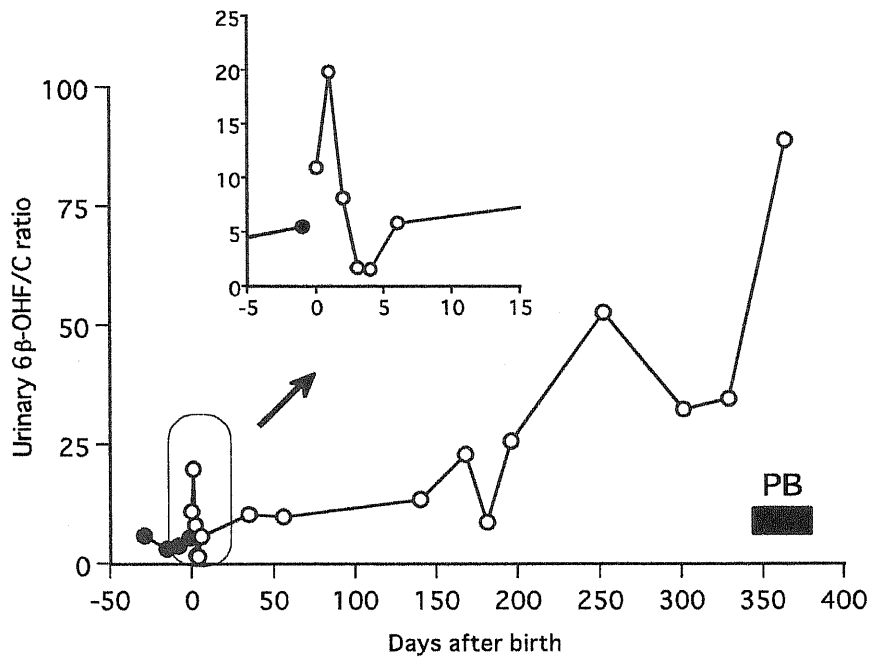
#### IV-3-2 結果

##### IV-3-2-a 出生後の尿中 $6\beta$ -OHF/C 比の変動

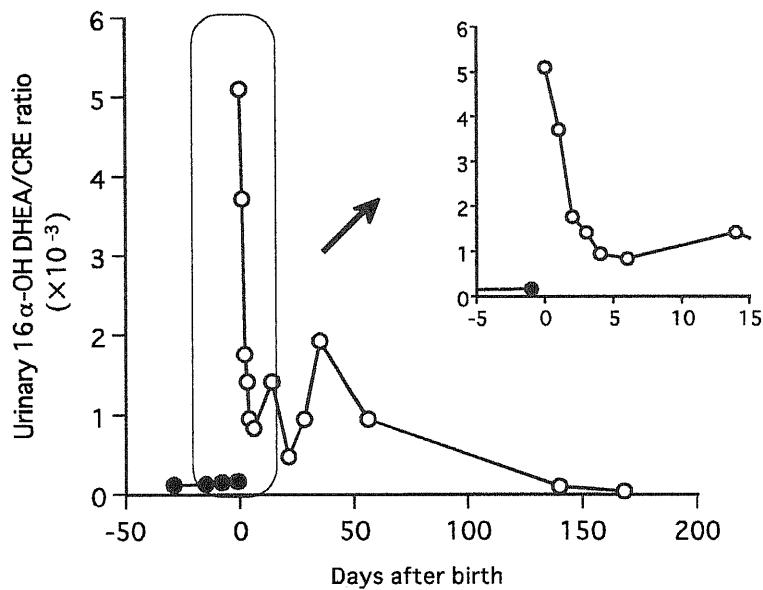
Fig. 4-5 に母親の出産前および子供の出生後の尿中  $6\beta$ -OHF/C 比の経日変化を示した。母親と比較し子供の尿中  $6\beta$ -OHF/C 比は出生当日で約 2 倍、1 日目で約 4 倍高値を示し、それ以降 4 日目まで経日的に低下し、3 日目、4 日目においては母親よりも低値となった。6 日目以降は経日的な増加に転じた。また、フェノバルビタールが投与された 364 日目の尿中  $6\beta$ -OHF/C 比は 88.8 と顕著に高値を示した。

##### IV-3-2-b 出生後の尿中 $16\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比の変動

Fig. 4-6 に母親の出産前および子供の出生後の尿中  $16\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比の経日変化を示した。子供の出生当日の尿中  $16\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比は母親（出産前日）と比較して顕著に高値を示した（5.104 vs 0.161）。子供の尿中  $16\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比は出生後 6 日目までは速やかに低下し、その後緩やかに低下し、6 ヶ月以降の尿中  $16\alpha$ -水酸化 DHEA は検出限界以下となった。



**Fig. 4-5 Changes in urinary 6β-OHF/C ratio after birth in a full term normal delivery neonate and mother.**  
 ○, Neonate; ●, Mother.



**Fig. 4-6 Changes in urinary 16α-OH DHEA/CRE ratio after birth in a full term normal delivery neonate and mother.**  
 ○, Neonate; ●, Mother.

## 第4節 考 察

本章においては、新生児の尿中ステロイド代謝物の経日的変化を追うことにより、出生後の CYP3A 酵素活性が如何に変化しているかについて検討を行った。

尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比を新生児の CYP3A 酵素活性の指標として検討を行ったところ、出生当日の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比は、在胎週齢および体重と有意な正の相関が認められ、満期以前で出産した新生児の CYP3A 活性は、満期で出生した新生児に比べて低いことが示唆された。また、満期で出生した新生児の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比は、これまでに我々が同じ方法で測定を行った健常成人の平均値 (8.90、n=37) よりも高値を示した。この原因として、臍帯血を経由して、母親側からの影響を受けている可能性が考えられた。そこで、満期正常分娩にて出生した新生児の出生当日と、その母親の出産後 2 時間の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比を比較することとした。その結果、検討を行った 17 例全例で、新生児の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比は母親よりも高値を示した。よって、新生児の出生当日にみられる尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比の高値は母親側からの影響による可能性は低いと考えられた。次に、出生後の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比の経日変化について検討を行った。その結果、在胎週齢 37 以上で出生した新生児の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比は出生後経日的に低下することが明らかとなり、出生後かなり早期に CYP3A 酵素の質的あるいは量的変化が起こっていることが示唆された。一方、在胎週齢 37 未満で出生した新生児においては、尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比は低値のまま出生後 14 日目まで大きな変動がみられなかったことから、未熟児では満期で出生した新生児と異なる CYP3A の発達過程をとる可能性が示唆された。

尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比は成人においては、CYP3A4 活性のマーカーとして広く使用されている。しかしながら、コルチゾールの 6 $\beta$ -水酸化は CYP3A4 に比べると低いながらも CYP3A7 によっても触媒されるため、尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比のみでは CYP3A4 と CYP3A7 の個々の変化を知ることはできない。そこで、次に CYP3A7 に極めて特異性の高い DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化反応に着目し、尿中 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA 濃度の測定を行った。CYP3A4 は硫酸抱合体である DHEA-S の 16 $\alpha$ -水酸化はほとんど触媒しないが、非抱合体の DHEA の 16 $\alpha$ -水酸化は CYP3A7 に比べるとやや低いながらも触媒する。しかし、新生児の血中 DHEA はそのほとんどが硫酸抱合体として存在していることから (50)、尿中排泄される DHEA 16 $\alpha$ -水酸化体の量は CYP3A7 活性を反映するものと考えられる。本来、基質である DHEA-S と代謝物の 16 $\alpha$ -水酸化体の比で比較すべきところであるが、尿中 DHEA 濃度の測定が夾雑物質の影響により困難であったため、尿中代謝物濃度での比較を行うこととし、尿量の補正を行う目的で尿中 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比として比較を行った。新生児における CRE 排泄量は、体重あたりほぼ一定といわれており、ほかの尿中排泄物を尿中 CRE で除して 1 日尿量の差、日内変動を補正することが行われている (51)。また、出生後の血中 DHEA-S 濃度は、副腎胎児層の退縮に伴い徐々に低下するものと考えられるが、過去の報告によると血中総 DHEA 濃度は出生後 10 日目までに顕著な低下はせず、25%程度の低下とされる (52)。よって、出生後 7 日目までの検討においては、基質濃度の変動はほとんどないものとし、代謝物濃度 (16 $\alpha$ -水酸化 DHEA 濃度) の変化を CYP3A7 活性の変化を反映するものとして差し支えないと考えられる。出生後の尿中 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比は、尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比同様、経日的な減少が認められ、7 日目までの低下率は尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比の低下率とほぼ同様であった。この結

果より、出生後 1 週間までの期間は CYP3A7 活性の低下のみが起こり、CYP3A4 活性の大きな上昇は起こっていないと考えられる。なぜならば、CYP3A4 活性の増加は、DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化活性には影響を及ぼすことなくコルチゾール 6 $\beta$ -水酸化活性を上昇させると考えられ、もし顕著な CYP3A4 の増加が起こっているとすれば、尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比と 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比の出生後の変化のパターンに差が認められるはずである。また、第 II 章の *in vitro* の検討において、DHEA-S の存在は CYP3A7 によるコルチゾール 6 $\beta$ -水酸化活性を活性化させたことから、出生後の尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比の経日的低下は CYP3A7 酵素量の変動によるものではなく、DHEA-S の濃度低下によるものとも考えることもできる。しかしながら、前述のごとく、血中 DHEA-S 濃度は少なくとも出生後 1 週間までは大きく低下しておらず、その可能性は低いと考えられる。従って、満期で出生した新生児においては、少なくとも出生後 1 週間までは CYP3A4 活性の顕著な上昇はなく、CYP3A7 活性の低下のみが起こっている可能性が高いと考えられた。

次に、さらに長期的に CYP3A 酵素活性の変化を追う目的で、1 名の女児について、出生後 1 年まで経時的に尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比および 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比の測定を行った。尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比は出生後 4 日目まで低下し、その後増加に転じた。一方、尿中 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比は、出生後 6 日目まで速やかに低下し、その後は緩やかに低下し、6 ヶ月以降の尿中 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA は検出限界以下となった。今回、1 年間の変化を追うことができたのは 1 例のみであったため、確定的なことは言えないが、CYP3A7 活性は出生後約 1 週間までに急激に低下し、その後緩やかな低下に転じると同時に CYP3A4 活性が徐々に立ち上がってくるものと考えられた。Lacroix らは、胎児、新生児、乳児期のヒト成人肝ミクロゾームを用い、出生後のテストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性および DHEA 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性の変化を経時的に測定している (15)。彼らは、出生後 1 週間以内の短い期間での変化についての検討は行っていないが、テストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性は出生後経時的に上昇し、1 才を越えると成人と同レベルに達すること、一方、DHEA 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性は、出生後は成人と比べて高い活性を示すが、その後 1 才まで経時的に低下したと報告している。これは、肝臓中の CYP3A4 の発現と CYP3A7 の減少は並行して同時に起こっていることを意味し、本研究における 1 年間の尿中ステロイド代謝物の変化と矛盾しないものである。

最後に、本研究で得られた結果を基に、CYP3A による薬物代謝活性が出生後如何に変化するかについて考察を試みた。

仮に、出生後 1 週間までは CYP3A7 の量的減少のみが起こり、DHEA-S の濃度低下はない。さらに、生後 1 週間以降 CYP3A7 の減少と CYP3A4 の発現が並行して同時に起こり、かつ DHEA-S 濃度が徐々に低下すると仮定する。この場合、出生後 1 週間までは、CYP3A7 の量的な減少による活性低下のみが起こると考えられる。ただし、薬物毎のクリアランスは CYP3A7 による代謝活性の大小および DHEA-S の活性へ及ぼす影響 (活性化あるいは阻害) の違いにより異なると考えられる。

CBZ および NVP の CYP3A7 による代謝活性は CYP3A4 と比較して顕著に低値を示したが、DHEA-S の存在により CYP3A7 による両薬物の代謝が活性化を受けた。よって、CYP3A7 および DHEA-S とも高含量で存在するこの時期、ある程度のクリアランスを有している可能性が考えられる。Singh らは、10 名の新生児における CBZ の体内動態パ

ラメータの算出を行っており、彼らは新生児の消失半減期 ( $T_{1/2}$ ) は約 24 時間と報告している (53)。これは、成人の初回投与時の平均 35 時間、反復投与後 10~20 時間 (54) と比較して、ほぼ同等といえる。また、Mirochnick らは、HIV 母子感染防止目的で NVP を出産前に母親に投与し、母親およびその子供の NVP 血中濃度を経時的に測定し、体内動態パラメータを算出している (55)。出生時の子供の血中 NVP 濃度は母体側とほぼ同濃度であり、興味深いことに、NVP の  $T_{1/2}$  は、母親とほとんど変わらない値を示した。NVP 代謝の一部には CYP2D6 (8 位、12 位水酸化)、CYP2B6 (3 位水酸化) が関与するとされているが (56)、この時期の CYP2D6 は酵素量、活性とも成人と比較して極めて低いことが報告されている (57)。また、CYP2B6 は、成人においても肝総 CYP に占める割合は低く (58)、新生児肝においては存在しないか存在したとしても極めて低含量と考えられる。よってこれらの分子種が新生児期の NVP 代謝に寄与している可能性は低く、新生児期における NVP 代謝は CYP3A7 によるものと考えられる。この様に、*in vitro* における CYP3A7 による CBZ および NVP の代謝活性は低いものの、DHEA-S の存在により代謝が活性化を受けることから、*in vivo* において新生児は成人と比較して遜色ない  $T_{1/2}$  を示すのではないかと考えられた。

一方、TZM および EM に関しては、DHEA-S による代謝活性化がないこと、さらに *in vitro* での CYP3A7 による代謝活性は CYP3A4 による代謝活性と比較して低値であったことから、この時期の *in vivo* での TZM および EM の代謝活性は低いことが予測される。TZM および EM の新生児期の体内動態に関する報告は見あたらないが、TZM と同じベンゾジアゼピン系薬物であるミダゾラムの新生児期におけるクリアランスは、小児、成人と比べて顕著に低いとする報告がある (59, 60)。

また、ZNS は *in vitro* においては CYP3A4 と CYP3A7 による代謝酵素活性に顕著な差が認められなかったが、CYP3A7 による ZNS 代謝は DHEA-S の存在により阻害を受けたことから、DHEA-S が高濃度に存在するこの時期の *in vivo* におけるクリアランスは他の薬物と比べて必ずしも高いとはいえないと考えられた。

次に、出生後 1 週間以降の変動に関してであるが、今回検討を行った薬物に対する代謝活性はいずれも CYP3A4 の方が CYP3A7 よりも高かったことから、CYP3A4 酵素量の増加に伴って代謝活性は上昇すると予測される。ただし、その代謝に CYP3A7 の寄与が大きい薬物、DHEA-S により CYP3A7 による代謝が活性化される薬物においては、CYP3A7 酵素量および DHEA-S 濃度の低下による影響が大きく、活性の立ち上がりが遅れる可能性が考えられる。いずれにしても、CYP3A7 から CYP3A4 への変換は過去の報告 (15) および本研究の出生後 1 年間の尿中ステロイド代謝物の測定結果より、1 年以内にほぼ完了するものと考えられた。



## 総括

本研究では、新生児期における適正な薬物投与設計を可能にするための基礎的データを得ることを目的に、新生児期の薬物代謝において特に重要と考えられる CYP3A による薬物代謝酵素活性について検討を行った。その結果を以下に要約する。

1. バキュロウイルス-昆虫細胞系により発現させた CYP3A4 および CYP3A7 を用い、各種薬物および内因性ステロイド代謝酵素活性の差異について比較検討を行った。発現 CYP3A4 および CYP3A7 による薬物代謝酵素活性は、今回検討を行った 5 種の薬物 (CBZ、NVP、TZM、EM、ZNS) すべてで CYP3A7 による代謝酵素活性は CYP3A4 によるそれを下回ったが、活性の差は薬物により異なることが明らかとなった。また、CYP3A4 と CYP3A7 による NVP および TZM 水酸化において部位指向性の差異が認められたことから、活性部位内部における基質の配置は両酵素間で差があることが示唆された。内因性ステロイド代謝酵素活性において、DHEA、DHEA-S の 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性は CYP3A7 の方が CYP3A4 よりも高かったが、テストステロン、コルチゾールおよびアンドロステンジオン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性は CYP3A4 の方が CYP3A7 よりも高かった。反応速度論的検討より、CYP3A4 と CYP3A7 の代謝活性の違いは基質と酵素のアフィニティーの差よりも最大代謝酵素活性の違いによると考えられた。また、CYP3A4 においては一部の基質で非 Michaelis-Menten 型の反応速度論曲線を示したが、CYP3A7 においては今回検討したすべての基質で Michaelis-Menten 型を示した。さらに、CYP3A7 の部位指向変異酵素を用いた検討より、CYP3A7 の DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化機能には、224 番目および 244 番目のリジンが重要である可能性が示唆された。(第 I 章)
2. 発現 CYP3A4、CYP3A7 およびヒト成人肝ミクロゾーム、胎児肝ホモジネートを用い、各種薬物代謝酵素活性に及ぼす内因性ステロイドの影響について検討を行った。発現 CYP3A4 およびヒト成人肝ミクロゾームにおいては、アンドロゲンにより CBZ 10,11-エポキシ化、NVP 2-, 12-水酸化酵素活性が活性化されたが、EM *N*-脱メチル化、ZNS 還元酵素活性は逆にアンドロゲンにより阻害された。一方、発現 CYP3A7 および胎児肝ホモジネートにおいては、DHEA-S により CBZ 10,11-エポキシ化酵素活性が活性化された。CYP3A4 による CBZ 10,11-エポキシ化の反応速度論曲線は、アンドロステンジオン添加によりシグモイド型から Michaelis-Menten 型に変化した。その理由として、アンドロステンジオンは site-1 への親和性が高いため、CBZ に代わって site-1 を占有することとなり、CBZ 代謝において site-1 の存在が無視できることになるためと考えられた。CYP3A7 による CBZ 10,11-エポキシ化および DHEA-S 16 $\alpha$ -水酸化は、両基質の共存において互いの代謝を阻害しなかったこと、いずれの反応速度論曲線も Michaelis-Menten 型で両者の共存によっても反応速度論曲線の型に変化が認められなかったことから、両者はそれぞれ独立の site で酵素と相互作用するものと考えられた。また、これら内因性ステロイドによる CBZ 代謝の活性化は、site-1 へこれら effector が結合することでの活性部位の構造変化、あるいは活性部位内での基質同士の相互作用により CBZ の site-2 への親和性が増

加したためと考えられた。(第II章)

3. CYP3A4 および CYP3A7 の活性ポケット内での CBZ と内因性ステロイドの分子間の相互作用について分子力場計算と密度汎関数理論を用いて検討を行った。その結果、CYP3A4 による CBZ 10,11-エポキシ化がアンドロステンジオンにより活性化された原因として、活性ポケット内で CBZ のカルボン酸アミドとアンドロステンジオンの A 環のカルボニル基とが水素結合することで安定化することが考えられた。また、CBZ の kinetic はシグモイド様曲線を示す原因として、CBZ のカルボン酸アミド同士が水素結合することで安定化することが考えられた。CYP3A7 では、活性ポケット内において CBZ が代謝される配置をとったときには、DHEA-S の 3 位の硫酸基と CBZ のカルボン酸アミドとが水素結合することにより安定化し、CBZ の代謝触媒効率が增大する可能性が示唆された。(第III章)
4. 尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比および 16 $\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比をそれぞれ CYP3A 活性、CYP3A7 活性の指標とし、CYP3A7 および CYP3A4 活性が出生後如何に変化するかについて検討を行った。尿中 6 $\beta$ -OHF/C 比、16 $\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比は共に出生後 7 日目までほぼ同様のパターンで経日的に低下したことから、出生後 1 週間までの期間は CYP3A7 活性の低下のみが起こり、CYP3A4 活性の上昇は起こっていないものと考えられた。さらに生後 1 週間以降は、16 $\alpha$ -水酸化 DHEA/CRE 比は緩やかに減少を続ける一方、6 $\beta$ -OHF/C 比は増加に転じたことから、CYP3A7 活性が緩やかに低下すると同時に CYP3A4 活性が徐々に上昇してくるものと考えられた。(第IV章)

新生児期の薬物代謝能に関しては現在、未解明な部分が非常に多いが、本研究で得られた基礎的データは、安全な新生児期の薬物療法の発展に寄与できるものと考えている。

## 参考文献

- (1) Burns LE, Hodgman JE and Cass AF; Fetal circulatory collapse in premature infants receiving chloramphenicol. *N Engl J Med* **261**: 1318-1321, 1959.
- (2) Silverman WA, Anderson DH and Blanc WA; A difference in mortality rate and incidence of kernicterus among premature infants allotted to two prophylactic antibacterial regimens. *Pediatrics* **18**: 614-625, 1956.
- (3) Gonzalez FJ; The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev* **40**: 243-288, 1988
- (4) Wrighton SA, Ring BJ, Watokins PB and Vandenbranden M; Identification of a polymorphically expressed member of the human cytochrome P450III family. *Mol Pharmacol* **36**: 97-105, 1989.
- (5) Aoyama T, Yamano S Waxman DJ, Lapenson DP, Meyer UA, Fischer V, Tyndale R, Inaba T, Kalow W and Gelboin HV; Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450III A gene product that is differentially expressed in adult human liver. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of cDNA-expressed hPCN and hPCN for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine. *J Biol Chem* **264**: 10388-10395, 1989.
- (6) Schuetz JD, Molowa DT and Guzelian PS; Characterization of a cDNA encoding a new member of the glucocorticoid-responsive cytochromes P450 in human liver. *Arch Biochem Biophys* **274**: 355-365, 1989.
- (7) Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, 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.
- (8) Kitada M, Kamataki T, Itahashi K, Rikihisa T, Kato R and Kanakubo Y; Purification and properties of cytochrome P-450 from homogenates of human fetal livers. *Arch Biochem Biophys* **241**: 275-280, 1985.
- (9) Kitada M, Kamataki T, Itahashi K, Rikihisa T and Kanakubo Y; P-450 HFLa, a form of cytochrome P-450 purified from human fetal livers, is the 16 $\alpha$ -hydroxylase of dehydroepiandrosterone 3-sulfate. *J Biol Chem* **262**: 13534-13537, 1987.
- (10) Komori M, Nishio K, Ohi H, Kitada M and Kamataki T; Molecular cloning and sequence analysis of cDNA containing the entire coding region for human fetal liver cytochrome P-450. *J Biol Chem* **105**: 161-163, 1989.
- (11) Komori M, Nishino K, Kitada M, Shiramatsu K, Muroya K, Soma M, Nagashima K and Kamataki T; Fetal-specific expression of a form of cytochrome P-450 in human livers. *Biochemistry* **29**: 4430-4433, 1990.
- (12) Domanski TL, Finta C, Halpert JR and Zaphiropoulos PG; cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450. *Mol Pharmacol* **59**: 386-392, 2001.
- (13) Westlind A, Malmebo S, Johansson I, Otter C, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M and Oscarson M; Cloning and tissue distribution of a novel human cytochrome P450 of the CYP3A subfamily, CYP3A43. *Biochem Biophys Res Commun* **281**: 1349-1355, 2001.
- (14) Gellner K, Eiselt R, Hustert E, Arnold H, Koch I, Haberl M, Deglmann CJ, Burk O, Buntfuss

- D, Escher S, Bishop C, Koebe HG, Brinkmann U, Klenk HP, Kleine K, Meyer UA and Wojnowski L.: Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics* **11**: 111-121, 2001.
- (15) Lacroix D, Sonnier M, Moncion A, Cheron G and Cresteil T.; Expression of CYP3A in the human liver. Evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *Eur J Biochem* **247**: 625-634, 1997.
- (16) Nakamura H, Hirai M, Ohmori S, Ohsone Y, Obonai T, Sugita K, Niimi H and Kitada M.; Changes in urinary 6 $\beta$ -hydroxycortisol/cortisol ratio after birth in human neonates. *Eur J Clin Pharmacol* **53**: 343-346, 1998.
- (17) Nakamura H, Hasagawa A, Kimura M, Yamagata S, Nakasa H, Osada H, Sekiya S, Ohmori S and Kitada M.; Comparison of urinary 6 $\beta$ -hydroxycortisol/ cortisol ratio between neonates and their mothers. *Br J Clin Pharmacol* **47**: 31-34, 1999.
- (18) Ohmori S, Nakasa H, Asamome K, Kurose Y, Ishii I, Hosokawa M and Kitada M.; Differential catalytic properties in metabolism of endogenous and exogenous substrates among CYP3A enzymes expressed in COS-7 cells. *Biochim Biophys Acta* **1380**: 297-304, 1998.
- (19) Santos A, Zanetta S, Cresteil T, Deroussent A, Pein F, Raymond E, Vernillet L, Risse ML, Boige V, Gouyette A and Vassal G.; Metabolism of irinotecan (CPT-11) by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. *Clinical Cancer Research* **6**: 2012-2020, 2000.
- (20) Pearce RE, Gotschall RR, Kearns GL and Leeder JS (2001) Cytochrome P450 involvement in the biotransformation of cisapride and racemic norcisapride in vitro: Differential activity of individual human CYP3A isoforms. *Drug Metab Disp* **29**: 1548-1554, 2001.
- (21) Williams JA, Ring BL, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD and Wrighton SA.; Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Disp* **30**: 883-891, 2002.
- (22) Kerr BM, Thummel KE, Wurden CJ, Klein SM, Kroetz DL, Gonzalez FJ and Levy RH.; Humanliver carbamazepine metabolism. Role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11-epoxide formation. *Biochem Pharmacol* **47**: 1969-1979, 1994.
- (23) Domanski TL, He YA, Harlow GR and Halpert JR.; Dual role of human cytochrome P450 3A4 residue Phe-304 in substrate specificity and cooperativity. *J Pharmacol Exp Ther* **293**: 585-591, 2000.
- (24) Korzekwa KR, Krishnamachary N, Shou M, Ogai A, Parise RA, Rettie AE, Gonzalez FJ and Tracy TS.; Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models. Evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites. *Biochemistry* **37**: 4137-4147, 1998.
- (25) Shou M, Grogan J, Mancewics JA, Krausz KW, Gonzales FJ, Gelboin HV and Korzekwa KR.; Activation of CYP3A4. Evidence for the simultaneous binding of two substrates in a cytochrome P450 active site. *Biochemistry* **33**: 6450-6455, 1994.
- (26) Shou M, Dai R, Cui D, Korzekwa KR, Baillie TA and Rushmore TH.; A kinetic model for the metabolic interaction of two substrates at the active site of cytochrome P450 3A4. *J Biol Chem* **276**: 2256-2262, 2001.
- (27) Nash T.; The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hantzsch reaction. *Biochem J* **55**:416-421, 1953.

- (28) Nakasa H, Komiya M, Ohmori S, Rikihisa T, Kiuchi M and Kitada M,: Characterization of human liver microsomal cytochrome P450 involved in the reductive metabolism of zonisamide. *Mol Pharmacol* **44**: 216-221, 1993.
- (29) Kawasaki T, Maeda M and Tsuji A,: Determination of 17-oxosteroids in serum and urine by fluorescence high-performance liquid chromatography using dansyl hydrazine as pre-labeling reagent. *J Chromatogr B* **226**: 1-12, 1981.
- (30) Marquardt DW,: An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J Soc Ind Appl Math* **11**: 431-441 1963.
- (31) Marill J, Cresteil T, Lanotte M and Chabot GG,: Identification of human cytochrome P450s involved in the formation of all-trans-retinoic acid principal metabolites. *Mol Pharmacol* **58**: 1341-1348, 2000.
- (32) Chen H, Fantel AG and Juchau MR,: Catalysis of the 4-hydroxylation of retinoic acid by CYP3A7 in human fetal hepatic tissue. *Drug Metab Dispos* **28**: 1051-1057, 2000.
- (33) Nakamura H, Nakasa H, Ishii I, Ariyoshi N, Igarashi T, Ohmori S and Mitsukazu M,: Effects of endogenous steroids on CYP3A4-mediated drug metabolism by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **30**: 534-540, 2002.
- (34) Watkins PB, Turgeon DK, Saenger P, Lowns KS, Kolars JC, Hamilton T, Fishman K, Guzelian PS and Voorhees JJ,: Comparison of urinary 6 $\beta$ -cortisol and erythromycin breath test as measures of hepatic P450 IIIA (CYP3A) activity. *Clin Pharmacol Ther* **52**: 265-273, 1992.
- (35) Watkins PB,: Noninvasive test of CYP3A4 enzymes. *Pharmacogenetics* **4**: 171-184, 1994.
- (36) Bersoff-Matcha SJ, Miller WC, Aberg JA, van Der Horst C, Hamrick Jr HJ, Powderly WG and Mundy LM,: Sex differences in nevirapine rash. *Clin Infect Dis* **32**: 124-129, 2001.
- (37) 矢内原巧,: 産婦人科医の DHA-S 研究, 東京, 医科学出版社, 88-90 1993.
- (38) Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S and Yawo H,: Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol. Chem* **274**: 17159-17163, 1999.
- (39) Kakyo M, Unno M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Iwasashi H, Nakai D, Seki M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S, Yawo H and Abe T,: Molecular characterization and functional regulation of a novel rat liver-specific organic anion transporter rlst-1. *Gastroenterology* **117**: 770-775, 1999.
- (40) Szklarz GD, Halpert JR,: Molecular modeling of cytochrome P450 3A4.: *J Comput Aided Mol Des* **11**: 265-272, 1997.
- (41) Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Zakrzewski VG, Montgomery JA, Stratmann Jr RE, Burant JC, Dapprich S, Millam JM, Daniels AD, Kudin KN, Strain MC, Farkas O, Tomasi J, Barone V, Cossi M, Cammi R, Mennucci B, Pomelli, Adamo C, Clifford S, Ochterski J, Petersson GA, Ayala PY, Cui Q, Morokuma K, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Cioslowski J, Ortiz JV, Baboul AG, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi, R Gomperts, RL Martin, DJ Fox, T Keith, MA Al-Laham, CY Peng I, Nanayakkara A, Gonzalez C, Challacombe M, WGill PM, Johnson B, Chen W, Wong MW, Andres JL, Gonzalez C, Head-Gordon M, Replogle ES, and Pople JA,: *Gaussian 98, Revision A.7, Pittsburgh PA, Gaussian, Inc.*, 1998.

- (42) Becke AD,: Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange,; *J. Chem. Phys*, **98**: 5648-5652, 1993.
- (43) Lee C, Yang W and Parr RG,: Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density,; *Phys. Rev. B* **37**: 785-789, 1988.
- (44) Masayuki Hata, Yoshinori Hirano, Tyuji Hoshino, and Minoru Tsuda : Monooxygenation Mechanism by Cytochrome P-450.: *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 6410-6416, 2001.
- (45) De Visser SP, Ogliaro F, Harris N, Shaik S.: Multi-state epoxidation of ethane by cytochrome P450: a quantum chemical study.: *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 3037-3047, 2001.
- (46) 京田 直子, CYP3A4 によるカルバマゼピンエポキシ化に関する量子化学的研究, 千葉大学薬学部 薬品物理化学研究室 卒論, 2002.
- (47) Joellenbeck L, Qian Z, Zarba A and Groopman JD,: Urinary 6 $\beta$ -hydroxycortisol/cortisol ratios measured by high-performance liquid chromatography for use as a biomarker for the human cytochrome P-450 3A4. *Cancer Epidem Biomar* **1**: 567-572, 1992.
- (48) Samaan GJ, Porquet D, Demelier JF and Biou D,: Determination of cortisol and associated glucocorticoids in serum and urine by an automated liquid chromatographic assay. *Clin Biochem* **26**: 153-158, 1993.
- (49) Paroni R, Arcelloni C, Fermo I and Bonini PA,: Determination of creatinine in serum and urine by a rapid liquid-chromatographic method. *Clin Chem* **36**: 830-836, 1990.
- (50) 矢内原巧, 平戸久美子, 佐藤直樹, 吉田信隆, 沖永荘一, 荒井 清,: 胎児副腎におけるステロイド合成. *日産婦誌* **28**: 1501, 1976.
- (51) 小川雄之亮, 多田 裕, 中村 肇, 仁志田博司,: 新生児学 第 2 版, 大阪, メディカ出版, 263, 2000.
- (52) Kojima S, Yanaihara T and Nakayama T,: Serum steroid levels in children at birth in early neonatal period. *Am J Obset Gynecol* **140**: 961-965, 1981.
- (53) Singh B, Singh P, al Hifzi I, Khan M and Majeed-Saidan M,: Treatment of neonatal seizures with carbamazepine. *J Child Neurol* **11**: 378-82, 1996.
- (54) Bertilsson L,: Clinical pharmacokinetics of carbamazepime. *Clin Pharmacokin* **3**: 128-143, 1978.
- (55) Mirochnick M, Fenton T, Gagnier P, Pav J, Gwynne M, Siminski S, Sperling RS, Beckerman K, Jimenez E, Yogev R, Spector SA and Sullivan JL,: Pharmacokinetics of nevirapine in human immunodeficiency virus type 1-infected pregnant woman and their neonates. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 250 Team. *J Infect Dis* **178**: 368-374, 1998.
- (56) Erickson DA, Mather G, Trager WF, Levy RH and Keirns JJ,: Characterization of the in vitro biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* **27**: 1488-1495, 1999.
- (57) Treluyer JM, Jacqz-Aigrain E, Alvarez F and Cresteil T,: Expression of CYP2D6 in developing human liver. *Eur J Biochem* **202**: 583-588, 1991.
- (58) Shimada T, Yamazaki H, Miura M, Inui Y and Guengerich FP,: Interindividual variations in

human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drug, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 414-423, 1994.

- (59) Burtin P, Jacqz-Aigrain E, Girard P, Lenclen R, Magny JF, Betremieux P, Tehiry C, Desplanques L and Mussat P; Population pharmacokinetics of midazolam in neonates. *Clin Pharmacol Ther* **56**: 615-25, 1994.
- (60) De Wildt SN, Hearn GL, Hop WC, Murry DJ, Abdel-Rahman SM and van den Anker JN; Pharmacokinetics and metabolism of intravenous midazolam in preterm infants. *Clin Pharmacol Ther* **70**: 525-531, 2001.